SÉRIE A, N° 4635
N° D'ORDRE : 5482

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Mr NAJEAN Yves

1re THÈSE. — "LES COMPORTEMENTS BIOLOGIQUES DU FER".

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.
"MÉCANISMES DU VIEILLISSEMENT ET DE LA MORT CELLULAIRE".

Soutenues le 9 DEC 1965 **devant la Commission d'examen.**

MM. TONNELAT *Président.*

MOREL
CHEVALLIER } *Examinateurs.*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0020

(janvier 1965)

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen : M. ZAMANSKY

BRELOT	T Analyse supérieure
PRENANT	T Anatomie et histologie comparée
GRASSE	T Evolution des êtres organisés
PREVOST	T Chimie organique
WYART	T Minéralo et cristallo
TEISSIER	T Zoologie
MANGENOT	T Biologie végé (Orsay)
AUGER	T Physique quantique et relativité
MONNIER	T Physiologie générale
PIVETEAU	T Paléontologie
ROCARD	T Physique ENS
CARTAN	T Mathématiques ENS
LAFITTE	T Chimie générale
N ...	T Géométrie supérieure
COULOMB	T Physique du globe
Mlle COUSIN	T Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T Chimie minérale
BOCQUET	T Zoologie
KASTLER	T Physique ENS
EPHRUSSI	T Génétique
RIVIERE	T Géologie SPCN et sédiment (Orsay)
GAUTHERET	T Biologie végétale PCB
LUCAS R.	T Recherches physiques
THOMAS A.	T Biologie cellulaire
ARNULF	T Optique appliquée
MORAND	T Physique enseignement
SOLEILLET	T Physique PCB
FORTIER	T Mécanique exp. des fluides
DRACH	T Zoologie
QUENEY	T Météo et dynamique atmos.
GALLIEN	T Embryologie
EICHORN	T Botanique
DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN
Mlle CAUCHOIS	T Chimie physique
THELLIER	T Physique du globe
L'HERITIER	T Radioélectricité Orsay
GRIVET	T Radioélectricité Orsay
PONCIN	T Mécanique générale
DU BREIL	T Arth. & théorie des nombres

QUELET	T Chimie organique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T Micropaléontologie
JUNG	T Géologie
TRILLAT	Microscopie et diffract-élec.
WIEMANN	T Chimie organ. & structu.
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
VASSY	T Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T Théorie physique
AMIEL	T Chimie générale
HOCART	T Minérall. et cristal.
J.P. MATHIEU	T Physique optique
COUTEAUX	T Cytologie
MAY	T Zoologie
CHOQUET	T Théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T Biologie végétale marine
GUINIER	T Physique des solides (Orsay)
JOST	T Physiologie comparée
FORTET	T Calcul des probabilités et physique mathématiques
SCHWARTZ	T Calcul dif. et intégral
CHOUARD	T Physiologie végétale
MALAVARD	T Aviation (technique aéron.)
NORMANT	T Synthèse organique
BENARD	T Chimie minérale
BUVAT	T Botanique ENS
DUGUE	T Statistique mathématiques
SOULAIRAC	T Phychophysiologie
ULRICH	T Physiologie végé appli.
MARECHAL	T Optique théo. et appli.
KIRRMANN	T Théories chimiques
CHADEFAUD	T Botanique
Mlle LE BRETON	T Physio. de la nutrition
LELONG	T Appli. de l'ana. à la géom.
DEVILLERS	T Anatomie et histo. comparée
EHRESMANN	T Topologir algébrique
FRANCON	T Physique SPCN
GLANGEAUD	T Géogra. Phys. et géol.
DODEMENT	T Mathématiques MGP
PISOT	T Technique math. de la physique
ROCH	T Géologie
SCHATZMANN	T Astrophysique
TERMIER	T Géologie générale

ZAMANSKY	T Mathématiques générales
LENNUIER	T Physique MGP
RIZET	T Génétique Orsay
ROUTHIER	T Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T Physique théorique
DIXMIER	T Mathématiques MPC
SOUCHAY	T Chimie générale
AIGRAIN	T Electrotechnique générale
BRUSSET	T Chimie systématique
M. LEVY	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme CHAIX	T Chimie biologique
Mme HUREL PY	T Biologie végétale PCB
PANNETIER	T Chimie générale
BRUN	T Mécanique des fluides I
LEDERER	T Chimie biologique (Orsay)
Mme DUBREIL	T Mathématiques (agréga.)
Mme LELONG	T Mathématiques II ENS
BELLAIR	T Géologie SPCN
COTTE	T Physique électricité
DUBOIS J.E.	T Chimie organique
LAMOTTE	T Zoologie ENS
MICHEL A.	T Chimie minérale Orsay
OLMER	T Energétique générale
ROUAULT	T Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T Chimie physique
BROSSEL	T Physique atomique
BUSER	T Physiologie comparée
CAMUS	T Physio végé
CASTAING	T Physique II thermo (Orsay)
CURIEN	T Mineralo et cristal.
MOYSE	T Physio végé. (Orsay)
Mme CHARNIAUX-COTTON	T Evolution des êtres organisés
POSSOMPES	T Zoologie
PULLMANN	T Chimie quantique
TEILLAC	T Physique nuc. et radioactivité (Orsay)
TONNELAT	T Biol. physico. chim.(Orsay)
VILLE	T Econométrie
WILLEMART	T Chimie PCB
DODE	T Chimie (Orsay)
FREYMANN	T Recherches physiques
GUINOCHET	T Biolo. végé. SPCN (Orsay)
ROLLET	T Chimie minérale
Mlle JOSIEN	T Chimie SPCN
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des

	groupes
ARNOULT	T Electronique Orsay
CHAPELLE	T Physique I (Orsay)
DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)
DENY	T Mathématiques générales (Orsay)
GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides
LUCAS	T Géologie
ALLARD	T Chimie physique
BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales (Orsay)
BRICARD	T Météor. et physique de l'at.
Mme ALBE FESSARD	T Psycho physio.
FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay)
M. JULIA	T Etudes des moléculaires complexes
LENDER	T Biologie animale SPCN Orsay
MAGAT	T Physico chimie des radio éléments
Mlle QUINTIN	T Electrochimie
MONOD	T Chimie du métabolisme
BENOIT	T Physio animale Orsay
DE POSEEL	T Analyse numérique
CHARLOT	T Chimie analytique
LEMEE	T Ecologie végétale Orsay
GUERIN	T Chimie MPC Orsay
CHATELET	T Chimie PCB
JEAN	T Physio. nucléaire Orsay
MATTLER	T Physique SPCN
BERGERARD	T Zoologie Orsay
BERTEIN	T Electronique Orsay
BOUISSIERES	T Radiochimie
Mme COUTURE	T Thermo et méca. physique
ELLEMBERGER	T Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
FRANC	T Biologie animale PCB
SCHNELL	Botanique tropicale
STLKOWSKI	T Physiologie végétale
ACHER	T Chimie biologique
BAUDOIN	T Biologie animale PCB
BEAUMONT	Biologie animale SPCN
BLAMONT	Géophysique ionosphère
BOUREAU	T Botanique
CURIE D.	Physique MGP
DURAND DELGA	T Géologie
FREON	T Chimie organique Orsay
HELLER	T Physiologie végétale
TORTRAT	T Calcul des probabilités
CAILLEUX	T Géologie SPCN

MAGNAN		Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appli. à la chimie théo. & à la phy. nuclé.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale SPCN
Mme CHOQUET BRUHAT		Mécanique analytique et méca. céleste
Mlle VEIL	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Méca. phys. et expérimentale
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
BROCHARD	T	Physique PCB (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématique I (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géogra. physique et géo. dynami.
COMOLET		Méca. des fluides
CORABOEUF	T	Physi. animale (Orsay)
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie animale PCB
JULLIEN J.		CHIMIE SPCN (Orsay)
MALGRANGE	T	Thecnique mathé. de la phys. Orsay
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE	T	Physique ENS (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	Math. ENS féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)
THIRY	T	Méca. céleste
ABELES		Physique SPCN
AMAT	T	Physique PCB
AUBOIN	T	Géologie
Mme BENOIT-GUEUTAL	T	Physique nucléaire et radio-activité (Orsay)
BOUGIS		Biologie marine Villefranche/mer
BRUHAT	T	Mathématique MPC
BRUNN	T	Géologie historique Orsay
CHABBAL	T	Physique MGP (Orsay)
DEHEUVELS	T	Mathématiques propé
D'ESPAGNAT	T	Physique théorique (Orsay)
FURON	T	Géologie SPCN
Mme GANS	T	Génétique
GENEVES		Biologie végétale PCB
GUILBERT		Physique CUS Orléans

HUPE	T Pétrographie
HOLLANDE	T Biolo. géné.
LIONS	T Analyse numérique
HAITTE	T Chimie PCB
MEYER	Physique propé
NICOLAS	Géologie appliquée
PANIGEL	Biologie générale
RAVIER	Pétrographie
ROSEAU	T Méca. théorique des fluides
ROUBINE	Electronique
SILBER	T Chimie PCB
UEBERSFELD	T Electronique
YVON	T Théories physiques
HERVE	T Mathématiques
NERON	T Mathématiques MPC (Orsay)
Mme PECKER WIMEL	T Astrophysique
BALKANSKY	Physique MPC
LE CORRE	T Electricité
DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)
GOURDIN	Physique théorique (Orsay) des hautes énergies
LEHMANN	T Phys. exp. des hautes énergies
NATAF	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
ECHALIER	Biologie animale PCB
BARRAUD	Physiolo. cellulaire
LIORET	Physiologie végé. Orsay
DARS	Géologie structurale & géolo. appli.
CAMEFORT	T Botanique (agrégation)
VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
BLAQUIERE	Electronique (Orsay)
ARNOUS	T Physique théorique
TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans)
MALLISIN	T Mathématiques propé (Orsay)
GAUDEMAR	Chimie propé
PEREZ Y JORBA	Physique Exp. des Htes énergies (Orsay)
DAVID	T Chimie (agrégation Orsay)
BROUSSE	T Mécanique théorique
ROSCH	T Astronomie
GUY	T Physique expérimentale
LAZARD	Mathématiques MPC
MOREL Pierre	Physique MPC
ARSAC	Programmation
LEFEBVRE	Chimie MPC
CHAPEVILLE	Biochimie

BENOIT	Physique CPEM
RIO	Chimie CPEM
JAUZEIN	Géologie ENS
PREVOST Georges	BV CPEM
FAVARD P.	BA CPEM
VILKAS	Chimie CPEM
Mlle FICINI	Chimie CPEM
LEQUEUX	Astronomie
COHEN TANNOUDJI	Physique MPC
TAVERNIER	Physique CPEM
Mme ROIZEN	" CPEM
DURAND M.	BA SPCN
PASCAUD	Physiologie
Mme PETIT	BA CPEM
BROUSSE	Géologie Orsay
CAGNIAC	Physique agrégation Orsay
LEBERRE	Zoologie (Orsay)
SCHEFFER	Microbiologie (Orsay)
de GENNES	Physique des solides (Orsay)
RIOU	Physique nuclé. exp. Orsay
CLAUSER	Chimie biolo. Orsay
CHEVALIER	Physio. animale Orsay
JANCOVICI	Physique atomique Orsay
FALK-VAIRANT	Physique nucléaire Orsay
FETIZON	Chimie propé Orsay
CERF	Mathématiques Orsay
LURCAT	Physique
RIGAUDY	Chimie SPCN
SIGWALT	Chimie SPCN
FOURNET	Electricité générale
COLLONGUES	Chimie CPEN
DUBERT	Biochimie
LAVOREL	Biologie physico chimique
MOREL F.	Physiologie comparée
TALBOT	Génétique chimique
Mme NOUGAREDE	Botanique
FRANCOIS	Zoologie
IVANOFF	Océanographie physique
CADIOT	Chimie organique
BARUCH	Physique propédeutique
NOZIERES	Physique générale
BOK	Physique propédeutique
SLONIMSKI	Génétique

Le Secrétaire général,

R. POULAIN

- à Monsieur le Professeur Jean BERNARD, qui nous a confié la charge de créer et de développer le laboratoire des Isotopes de l'Hôpital Saint-Louis, et a bien voulu nous donner son appui permanent. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre gratitude et de notre respect.

- à tous les collaborateurs et collaboratrices du laboratoire des Isotopes de l'Hôpital Saint-Louis, sans l'aide desquels ce travail n'aurait pu voir le jour. Ils savent quelle reconnaissance nous leur en avons.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

ETUDE DES COMPARTIMENTS METABOLIQUES DU FER

Le fer, bien que présent dans l'organisme vivant en très petites quantités, est un métal indispensable à la vie. Un grand nombre de maladies humaines impliquent un trouble de son métabolisme : les carences touchent des millions d'hommes parce que le fer assimilable est rare dans la nature ; les surcharges, dues à une cause nutritionnelle (alcoolisme) ou génétique (thalassémie, hémochromatose) aboutissent à une cirrhose, une insuffisance poly-endocrinienne et à la mort. Il est devenu nécessaire, dans de multiples disciplines cliniques, de savoir mesurer l'absorption, l'utilisation, la mise en réserve du fer.

Des progrès techniques ont stimulé la recherche sur les voies métaboliques du métal. Depuis 30 ans on sait doser le fer à des taux très bas, et reconnaître deux types de fer de réserve, l'hémosidérine et la ferritine. La coloration au bleu de Prusse localise les dépôts de fer dans et hors des cellules. La microscopie électronique, qui a su reconnaître la structure particulière hexaëdrique de la ferritine, montre le lieu exact d'une mise en réserve excessive, à l'échelon sub-cellulaire.

La méthode isotopique fournit une autre approche du métabolisme. Elle permet de mesurer quantitativement les mouvements du fer à travers l'organisme, ce que ne permet aucune autre méthode. Elle met en évidence des compartiments métaboliques importants bien que jusqu'alors ignorés. Couplée à des méthodes cliniques et autoradiographiques elle permet de préciser la nature de tels compartiments et de les localiser.

Dans les conceptions classiques du métabolisme du fer, trois compartiments dynamiques seulement sont pris en considération : un compartiment de transport, où un ou deux atomes de fer sont liés à une protéine spécifique, la sidérophiline ou transferrine; un compartiment d'utilisation, l'hémoglobine, qui contient 65 % du fer total d'un organisme humain en état stable; un compartiment de réserve, où le fer se trouve à peu près à parties égales réparti dans la ferritine soluble dans l'eau (dont le fer est facilement mobilisable) et dans l'hémosidérine insoluble (dont le fer est très lentement mobilisable). Le fer de la myoglobine, à renouvellement très lent, et le fer des enzymes porphyriniques (cytochromes, catalase, peroxydase) et flaviniques, quantitativement peu important, comptent très peu dans la cinétique d'ensemble du fer de l'organisme.

Depuis quelques années on a insisté sur l'existence de compartiments non héminiques, métaboliquement actifs. Ils ne représentent qu'un poids modeste de métal mais paraissent régulariser à tous les étages la saturation de la protéine de transport. C'est ainsi qu'un compartiment non héminique parait régler la vitesse ou le taux de transport de fer à travers la muqueuse duodénale (31). Nous chercherons à démontrer dans ce travail que le taux stable de la saturation en fer de la sidérophiline plasmatique est dû à l'équilibre avec un compartiment échangeable cinq à dix fois plus grand que celui de transport, ce qui permet au compartiment de fournir tout au long de la journée le fer nécessaire à l'appareil érythropoïètique, malgré les apports digestifs discontinus ; ceci est important pour assurer une synthèse d'hème régulière, puisque le taux de fixation de fer au récepteur érythroblastique est dépendant de la saturation en fer de la protéine plasmatique de transport (73, 103). D'autre part, dans la cellule utilisatrice elle-même, nous montrerons que la synthèse se fait à partir d'un système de compartiments interposés entre le fer extérieur et le point d'utilisation.

La première partie de ce travail sera consacrée à la cinétique du fer dans la cellule rouge immature in vitro. On a utilisé pour cette étude les réticulocytes et les érythroblastes de rat, de lapin, et d'homme, et comme traceur le radiofer 59. On tentera de définir les règles de régulation de la fixation du fer ; on définira l'existence, la taille, et la vitesse de renouvellement de compartiments métaboliques intra-cellulaires non héminiques.

La seconde partie sera consacrée à la cinétique du fer dans l'organisme entier. A partir de l'étude de la vitesse de fuite du fer hors du plasma, et de la vitesse de son incorporation dans les hématies circulantes, on a pu démontrer l'existence de compartiments métaboliques insoupçonnés. L'étude mathématique a pu être complétée par une mesure directe du fer non héminique dans les divers organes. Un modèle métabolique a pu être dessiné, et peut être utilisé dans les conditions d'un métabolisme normal et dans les conditions pathologiques.

LAUFBERGER a pu dire en 1934 que "beaucoup de questions biologiques et quantitatives n'auront leur réponse que lorsqu'on connaîtra la nature chimique et les combinaisons du fer dans les organes où il se dépose". Ce travail est encore en cours et l'on ne pourra exposer que quelques faits, qui tous appuient les considérations précédentes sur la cinétique du métal dans la cellule.

On peut espérer que la meilleure connaissance de la physiologie du fer, notamment de la régulation de ses mouvements d'un compartiment à un autre, aura d'intéressants prolongements dans l'étude physio-pathologique des anomalies humaines du métabolisme du fer.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DU FER DANS L'ERYTHROBLASTE ET LE RÉTICULOCYTE

L'existence de compartiments métaboliques intra-cellulaires du fer est prouvée par de très nombreux faits. Les documents microscopiques et électromicroscopiques (15) démontrent la présence dans l'érythroblaste de fer non-héminique, sous une forme et dans une localisation variable selon les états pathologiques; mais ces méthodes ignorent évidemment la provenance, l'utilisation, la vitesse de renouvellement de ce fer. Les méthodes chimiques ont mis en évidence la présence dans les cellules d'un fer non héminique (57, 91, 95, 127, 143); elles ont tenté d'en préciser la nature et, après marquage isotopique, l'activité spécifique en fonction du temps, dans le but de déterminer si ce fer est ou non un précurseur de l'hème; mais les résultats sont encore contradictoires.

Nous avons cherché, par diverses méthodes, à mesurer la taille et les mouvements des compartiments métaboliques intracellulaires du fer, et à étudier le procédé de régulatisation de la fixation globulaire de ce métal. Cette étude au niveau de la cellule utilisatrice a un double intérêt. D'une part elle peut permettre de mieux comprendre le mécanisme de certaines surcharges, comme le saturnisme et la thalassémie. D'autre part elle peut servir à vérifier les conceptions générales selon lesquelles le "volant régulateur" du compartiment de transport plasmatique est érythroblastique (104, 120) ou au contraire, comme nous le pensons, extra-érythroblastique.

Chapitre 1

METHODES UTILISEES

Les méthodes utilisées comportent essentiellement des mesures des mouvements du fer 59 et le calcul de la synthèse héminique à partir de celui-ci et d'autres précurseurs de l'hème: glycine et acide delta-amino-lévulinique, marqués par le radiocarbone C 14.

1) Techniques

La méthode générale utilisée compare, le même jour et dans les mêmes conditions, la fixation globulaire et l'incorporation dans l'hème cristallisé de fer 59, de glycine-2-C.14 et d'acide delta-amino-lévulinique-4-C.14.

Le sang prélevé sur héparine est lavé une fois par du sérum physiologique glacé hépariné. L'incubation avec le matériel radioactif se fait pendant 3 ou 4 heures en bain-marie à 37°C, sous atmosphère d'air, avec agitation manuelle ou automatique. En dehors des cas où ceci est autrement précisé, les chiffres pondéraux de fixation du fer ou de synthèse d'hème sont ceux observés après une incubation de 3 heures. Nous avons à de nombreuses reprises constaté que, dans ces conditions et ces limites de temps, l'hémolyse est négligeable et que la synthèse horaire d'hème à partir de la glycine est à peu près constante. A la fin de l'incubation, le culot cellulaire est lavé trois fois par du sérum physiologique glacé hépariné. Un échantillon de volume connu de ce culot est compté; le reste du culot globulaire subit une cristallisation de l'hème par la méthode de LABBE et NISHIDA (82) avec correction pour le rendement de la cristallisation.

Il est possible d'étudier simultanément la synthèse d'hème à partir de fer 59 et de glycine-C 14, soit en disposant d'un scintillateur liquide, soit en comptant le même échantillon successivement dans un scintillateur solide et dans un compteur Geiger à flux gazeux; dans le premier appareil le fer seul est mesuré, dans le second on compte la radioactivité de l'émission bêta du fer et du carbone; si on connaît l'efficacité respective d'une dose standard de fer dans l'un et l'autre appareil, on peut calculer l'activité réelle du C 14 de l'échantillon étudié. Il faut en outre que le poids/cm2 de la dose standard de fer soit le même que celui de l'échantillon étudié, parce que l'auto-absorption du rayonnement du fer n'est pas le même que celle du rayonnement du carbone. Aussi n'a-t-on utilisé cette technique et ce mode de calcul que dans les cas où la quantité de sang à étudier était minime; dans la plupart des expériences chaque isotope était apporté séparément à une fraction égale du même culot globulaire.

Le fer 59 était apporté sous forme liée à la transferrine plasmatique (incubation à 37° du plasma et de Cl^3 Fe à haute activité spécifique, pendant 20 minutes). Dans le cas où on comparait la synthèse héminique dans deux culots globulaires différents, on utilisait comme vecteur du fer un seul plasma normal, isogroupe pour les divers culots globulaires.

La glycine-2-C.14 et l'acide delta-amino-lévulinique (ALA) étaient apportés au culot globulaire, soit en suspension dans du sérum physiologique, soit en suspension dans du plasma frais. Il a été observé que, du moins dans les courtes durées d'incubation, l'utilisation pour l'hème du C.14 de ces deux substances se faisait de façon à peu près semblable, que l'incubation ait lieu en plasma ou en milieu salin. Ce fait n'est pas vrai pour des durées d'incubation plus longues.

L'activité spécifique du fer utilisé était comprise entre 3 et 15 microcuries par microgramme; celle de la glycine était de 10 mc par m-mole; celle de l'ALA était de 4 mc par m-mole. Le fer était compté par un scintillateur à cristal-puits d'iodure de sodium activé au thallium. Le carbone était compté dans un flow-compteur à fenêtre très mince et tous les échantillons pesés pour corriger le résultat obtenu par l'auto-absorption.

Dans de nombreux cas, on a étudié l'utilisation du fer et la synthèse d'hème à partir de glycine ou d'ALA dans des conditions différentes: en présence d'agents réducteurs, de nucléosides, d'inhibiteurs enzymatiques; après marquage in vitro un temps variable et remise en incubation dans un milieu de suspension neuf; après fixation de fer in vivo et remise en incubation du sang dans un plasma non marqué in vitro. Les techniques particulières utilisées dans ces diverses expériences seront détaillées à propos de l'exposé de leurs résultats. Dans le cas où on cherchait à localiser le fer intra-cellulaire, on séparait les composants cellulaires -stroma, mitochondries, ribosomes, surnageant - par sédimentation fractionnée (3, 78, 100); les cellules lavées étaient lysées par 4 volumes de $Mg\,Cl^2$ 5.10^{-3}M et 1 volume de saccharose 1,5 M contenant 0,15 M de K Cl; le stroma était précipité par deux centrifugations de 20mn à 3000 g, les mitochondries par une centrifugation du surnageant de 15 minutes à 10.000 g, les ribosomes par une centrifugation de 100.000 g pendant 60 minutes. Pour débarrasser au maximum le stroma de l'hémoglobine il était lavé avec du sérum salin acidifié par acide acétique à pH 5,5.

2) Matériel

Les cellules utilisées pour cette expérimentation étaient des cellules fraîches de lapin, de rat ou d'homme; un culot globulaire d'homme normal était systématiquement utilisé comme témoin dans toute expérience quantitative portant sur un culot globulaire humain pathologique.

Le sang riche en réticulocytes provenait d'anémies hémolytiques humaines sans trouble de métabolisme du fer (microsphérocytose héréditaire), ou de lapins et de rats ayant reçu 5 jours auparavant une dose de 15 mg/Kg d'acétyl-phénylhydrazine.

Le saturnisme a été réalisé expérimentalement chez le lapin et le rat, par 4 injections à 2 jours d'intervalle d'une dose de 50 mg/kg d'acétate de plomb. On a étudié l'apparition progressive des anomalies du métabolisme du fer intra-cellulaire, en tuant chaque jour un rat et en mesurant la fixation globulaire et l'utilisation du fer in vitro. Dans d'autres expériences on a seulement utilisé le sang d'animaux en pleine phase de saturnisme au 15ème jour après la 4ème injection du sel de plomb; on a vérifié la présence à cette période de stigmates de l'intoxication : hyperprotoporphyrinémie globulaire, hypersidérémie, granulations basophiles érythrocytaires.

Les anémies hypochromes hyposidérémiques et les anémies par "dysérythropoïèse" avec trouble du métabolisme du fer (thalassémies majeures, anémies hypo-ou normochromes hypersidérémiques) ou sans trouble du métabolisme du fer (anémies de BIERMER, pancytopénies chroniques) étaient toutes des anémies humaines. Ces malades ont pour la plupart subi à cette période une étude du métabolisme du fer in vivo dans un but de diagnostic ou de pronostic; les faits observés in vitro pouvaient donc le plus souvent être comparés avec certaines des constatations faites in vivo. Des hématies de sujets en aplasie (toxique ou leucémique) et de rats rendus aplasiques par une dose de 400 r in toto reçue 5 jours auparavant ont également été utilisées.

Dans quelques cas on a utilisé in vitro la moelle du fémur de rats; l'os était fendu dans le sens de la longueur, gratté et les cellules mises en suspension dans une solution de RINGER, les amas cellulaires étant désagrégés par plusieurs aspirations successives à travers une aiguille de très faible calibre. Dans les expériences qui sont rapportées dans ce travail, l'étude de la synthèse d'hème par des milieux acellulaires n'a pas été utilisée.

3) Mode de calcul

On a cherché à toujours mesurer l'activité fixée et utilisée en poids de fer. La quantité de fer fixée est la suivante :

1) Quantité de fer fixé = taux du fer sérique (en microgrammes par ml) x volume du plasma utilisé pour l'incubation (en ml) x pourcentage du fer fixé.

La sidérémie est mesurée par la méthode classique de HEILMEYER et PLOTTNER à l'orthophénantroline; le pourcentage du fer fixé est le rapport de l'activité du culot lavé à l'activité totale amenée au début de l'expérience.

La quantité d'hémoglobine synthétisée de novo à partir du fer plasmatique est la suivante :

2) Quantité d'hémoglobine synthétisée = quantité de fer fixé x pourcentage d'utilisation héminique x 1000 /3,4

Le pourcentage d'utilisation est le rapport de l'activité trouvée dans l'hème (après cristallisation et correction pour le rendement de la cristallisation) à l'activité totale fixée. La valeur 1000/3,4 est le rapport du poids d'une molécule d'hémoglobine au poids de fer qu'elle contient.

Cette valeur, qui ne mesure que l'hémoglobine à partir de fer extérieur à la cellule, est comparée au taux de synthèse à partir de glycine-C 14, donné par la formule suivante :

3) Hémoglobine synthétisée = glycine contenue dans un ml de plasma (ou de sérum salin) x volume de plasma (ou de sérum salin, en ml) x pourcentage d'utilisation x 1,03 x 1000/38.

La quantité de glycine du milieu extérieur, apportée sous forme de glycine-C 14 était dans tous les cas de 20 microgrammes par ml; dans le cas d'incubation en milieu plasmatique, on considérait (10,20) qu'un ml de plasma contient 15 microgrammes de glycine libre. Le pourcentage d'utilisation est le rapport de l'activité héminique (après correction pour l'auto-absorption) à l'activité totale fournie. Le rapport pondéral de 8 molécules de glycine à 1 molécule d'hème est de 1,03 à 1 et celui d'une molécule d'hème à une molécule d'hémoglobine est de 38 à 1000. Cette valeur n'indique que le taux de synthèse à partir de la glycine extérieure à la cellule.

L'hémoglobine synthétisée à partir d'ALA est calculée selon la formule suivante, le rapport pondéral de 8 molécules de chlorhydrate d'ALA à une molécule d'hème étant de 2,15 à 1 :

4) hémoglobine synthétisée = poids de l'ALA apporté dans le milieu d'incubation x pourcentage d'utilisation x 1/2,15 x 1000/38

Tous les chiffres obtenus étaient rapportés au taux absolu des réticulocytes du culot globulaire; les réticulocytes étaient comptés avec une erreur inférieure à 10 % , par coloration vitale au bleu de UNNA.

Diverses vérifications ont été faites pour minimiser dans la mesure du possible les erreurs expérimentales. Il a été vérifié que trois lavages suffisent pour éliminer le fer, la glycine ou l'ALA non fixée (les lavages supplémentaires n'enlèvent pas de radioactivité). Il a été vérifié que la technique de cristallisation de l'hème et de lavage du produit cristallisé est fidèle et qu'on ne compte aucune activité non incorporée à l'hème. De même on a vérifié que les résultats donnés par cette technique simple sont les mêmes que ceux obtenus par cristallisation de la méthyl-ester-protoporphyrine (49). La plupart des expériences ont été faites en double et on n'a jamais observé de différence de plus de 3 % entre deux échantillons traités de façon similaire. Enfin, les temps de comptage étaient tels que l'erreur statistique de comptage soit inférieure à 5 % , même à des taux très bas d'activité.

Chapitre 2

ETUDE DE LA FIXATION GLOBULAIRE DU FER IN VITRO

La fixation du fer sur les cellules de la lignée érythrocytaire dépend à la fois du récepteur et du transporteur. La corrélation entre le taux de fixation de fer et la qualité du récepteur cellulaire - immaturité, activité métabolique, état de la membrane - a été longuement étudiée, notamment par JANDL et Coll. (2, 68,69). Nous n'exposerons dans ce chapitre que les résultats des expériences concernant la fixation du fer, sur un même culot globulaire :

a) en fonction de l'activité de synthèse héminique des cellules réceptrices;
b) en fonction de la quantité ou de la qualité du plasma apportant le fer.

1) Absence de parallèlisme entre le taux de fixation globulaire du fer et le taux de synthèse d'hème in vitro.

Il n'y a pas d'interdépendance immédiate entre le taux de la fixation globulaire du fer et le taux de la synthèse héminique.

a) Le taux de fixation globulaire du fer est faible, mais non nul, sur un culot globulaire pauvre en réticulocytes où la synthèse héminique à partir de glycine marquée se poursuit. De même les expériences de vieillissement des cellules in vivo et in vitro montrent que la fixation et l'utilisation de fer plasmatique s'effondrent alors que la synthèse héminique vraie, mesurée à partir de la glycine radioactive, ne diminue que lentement (tableaux du chap. 3, IV).

b) Certains agents chimiques bloquent la synthèse héminique sans empêcher la fixation globulaire du fer : cyanure de potassium, acétate de plomb, puromycine (tableau 1).

c) Certains agents augmentent la synthèse d'hème, jugée par l'utilisation héminique de la glycine 2-C_{14}, sans modifier sensiblement la fixation globulaire du fer plasmatique, et donc agissent en favorisant la mise en activité de réserves de fer intra-globulaires (tableau 2).

d) La fixation globulaire est augmentée dans des cas où la synthèse elle-même ne l'est pas parce que dans ces cas les réserves intra-cellulaires sont vides et que le seul fer utilisable est celui du milieu extérieur. C'est le cas des anémies hypochromes hyposidérémiques (tableau 3).

Cette indépendance entre la fixation du fer et son utilisation ne peut être que limitée à un temps court, comme celui des expériences faites in vitro. Cette observation est cependant importante. Elle suggère l'existence d'un compartiment intra-cellulaire susceptible de fournir du fer pour l'hème alors même que la fixation est bloquée, ou temporairement insuffisante (sidérophiline désaturée). Elle explique pourquoi les érythroblastes de certaines hémopathies (saturnisme, thalassémie), où le taux de synthèse par cellule est diminué, accumulent inutilement du fer.

Tableau 1

DISSOCIATION ENTRE LA FIXATION GLOBULAIRE DU FER ET SON TAUX D'UTILISATION POUR L'HEME
(Sang de rat normal)

	Cyanure de potassium			
Fixation globulaire du fer	5.10^{-3}M	2.10^{-3}M	1.10^{-3}M	$0.5.10^{-3}$M
(par rapport à la normale = 100)	21	68	100	100
Utilisation héminique du fer en % de la quantité fixée (témoin = 60 %)	1 %	3.2 %	3.6 %	11 %

	Acétate de plomb, incubation préalable de 15 mn, puis lavage			
Fixation globulaire du fer	témoin	$0.5.10^{-3}$M	1.10^{-3}M	2.10^{-3}M
(par rapport à la normale = 100)	100	99	180	269
Utilisation héminique du fer en % de la quantité fixée	38 %	11 %	2.8 %	1.1 %

Incubation en plasma marqué en présence de puromycine (10^{-3}M)

	incubation de 15 mn	incubation de 45 mn
Activité fixée par rapport au témoin	79	60
Activité utilisée pour l'hème par rapport au témoin	30,5	24

Tableau 2

FIXATION GLOBULAIRE ET UTILISATION HEMINIQUE
EN PRESENCE DE CYSTEINE

	témoin	$0.5.10^{-3}$M	1.10^{-3}M	5.10^{-3}M
Fixation globulaire du fer par rapport à la normale	100	100	106	106
Synthèse héminique à partir de glycine 2-C_{14}	100	135	210	128

Tableau 3

INDEPENDANCE ENTRE LE TAUX DE SYNTHESE HEMOGLOBINIQUE
ET LA FIXATION GLOBULAIRE
(moyenne de 14 anémies hyposidérémiques et de 14 témoins
testés le même jour)

	Anémies hypochromes hyposidérémiques	Sujets normaux
Fixation du fer ($10^{-5}\gamma$ /10^7 réticulocytes)	131	11
Synthèse héminique mesurée à partir de glycine 2-C_{14} ($10^{-3}\gamma$ d'hémoglobine/10 réticulocytes	172	160

2) Influence de la quantité et de la qualité du plasma

a) Quantité du plasma

Plusieurs expériences, utilisant comme substrat des culots globulaires riches ou pauvres en réticulocytes, de lapin, de rat et d'homme, ont montré une influence de la quantité de plasma sur la fixation globulaire du fer. Un exemple est donné dans le tableau 4.

Tableau 4

INFLUENCE DE LA QUANTITE DU PLASMA SUR LA FIXATION GLOBULAIRE DU FER

Quantité de plasma marqué	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,4	ml
Sérum salin	1,2	1	0,8	0,6	0,4	0	ml
Fer fixé (10^{-5} γ)	73	90	110	109	160	185	
Quantité de plasma marqué	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	ml
Quantité de plasma non marqué	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2	ml
Sérum salin	0	0	0	0	0	0	
Fer fixé (10^{-5} γ)	85,5	108,2	125	136,1	151	152,5	
Quantité de plasma marqué	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	ml
Quantité de plasma non marqué	0	0,2	0,5	0,8	1,2	1,8	ml
Sérum salin	0	0	0	0	0	0	ml
Fer fixé (10^{-5} γ)	64,5	73	78	89,5	111	119	

Dans les deux premières expériences, le volume total était constant ; la quantité de plasma et sa concentration étaient variables. Dans la dernière expérience le volume total était variable; la quantité de plasma était variable mais sa concentration en fer était constante. Le fait qu'une augmentation de la fixation globulaire du fer soit observée dans les deux types d'essai montre que c'est la quantité du matériel apporté et non sa concentration qui est responsable de l'augmentation de la fixation globulaire du fer.

b) Qualité du plasma. Rôle de la saturation en fer de la transferrine.

Du plasma isogroupe de divers sujets humains a été utilisé pour étudier l'influence de la qualité du plasma sur la fixation cellulaire du fer. On a vérifié au préalable que la fixation de fer au même culot cellulaire était la même à partir de différents plasmas normaux (tableau 5).

La fixation de fer sur un culot globulaire a été étudiée à partir de 76 plasmas pathologiques; dans chaque cas on comparait la fixation de fer à celle mesurée dans les mêmes conditions et sur les mêmes cellules à partir d'un plasma normal. Il est évidemment nécessaire d'exprimer les résultats en poids de fer fixé et non en pourcentage fixé par rapport à l'activité totale; en effet, si la sidérémie est augmentée, le pourcentage d'activité fixée peut être diminué mais le poids de fer fixé augmenté par rapport au témoin. D'autre part, en cas d'hypersidérémie, la liaison du traçeur à la sidérophiline peut être défectueuse ou nulle et le taux de fixation cellulaire de radioactivité n'aurait alors pas de signification; on a évité cette difficulté en liant dans ce cas le traceur à une petite quantité de plasma normal et en l'ajoutant secondairement au plasma pathologique saturé à étudier.

Les résultats observés, indiqués sur le tableau 6, montrent une bonne corrélation entre le taux de fixation du fer et le taux de la sidérémie.

Cette corrélation a été confirmée en utilisant un plasma normal marqué, progressivement saturé en fer non radioactif par adjonction de sulfate ferreux (Tableau 7). Ce tableau indique en outre l'absence d'activation de la synthèse d'hème alors que la fixation cellulaire du fer augmente.

La relation indiscutable entre le taux de la sidérémie et le taux de fixation globulaire du fer est importante, sur le plan théorique et sur le plan pratique. Sur le plan théorique, elle suggère que le fer joue un rôle dans le phénomène de fixation de la protéine transportrice à la membrane de la cellule utilisatrice; on sait d'ailleurs que certains caractères de la transferrine, sa stabilité et peut-être sa forme, varient selon le nombre d'atomes de fer qu'elle porte (72); on a montré que la fixation globulaire de transferrine iodée était d'autant plus grande qu'elle était davantage saturée en fer (69); la fixation préférentielle au réticulocyte de la transferrine chargée de fer

Tableau 5

LE FER EST FIXE ET UTILISE DE FACON SEMBLABLE PAR UN MEME CULOT CELLULAIRE (HOMME NORMAL) A PARTIR DE DIFFERENTS PLASMAS HUMAINS NORMAUX

Plasma utilisé	sujet 1	sujet 2	sujet 3	sujet 4	sujet 5	sujet 6	sujet 7
ncorporation globulaire 10^{-3} γ/10^7 réticulocytes	0,20	0,21	0,19	0,23	0,20	0,20	0,18
ncorporation hémoglobinique 10^{-3} γ d'hémoglobine/10^7 réticulocytes	23,5	22	21	24	26	27	22,5

Tableau 6

CORRELATION ENTRE LE TAUX DE LA SIDEREMIE ET LA FIXATION GLOBULAIRE DU FER

Taux de la sidérémie (en pour 100 ml)	Nombre de cas étudiés (2)	Taux de la fixation globulaire exprimé par comparaison avec celui observé le même jour à partir d'un plasma normal (1)	
		Moyennes et résultats extrêmes	erreur - standard de la moyenne
0 à 50 γ/100 ml	7	0,68 (0,4 - 1,1)	0,08
50 à 100 γ/100 ml	14	0,86 (0,5 - 2,3)	0,07
100 à 150 γ/100 ml	14	1,40 (0,7 - 4,6)	0,14
150 à 200 γ/100 ml	16	2,4 (0,8 - 4,2)	0,21
200 à 250 γ/100 ml	18	3,4 (1 - 7,2)	0,24
plus de 250 γ/100 ml	7	3,6 (1,9 - 4,7)	0,44

1) le plasma normal utilisé était celui d'un sujet dont la sidérémie était remarquablement stable entre 110 et 130 γ/100 ml.
2) le fer radioactif était ajouté directement au plasma à étudier. Dans tous les cas où la sidérémie dépassait 200 γ/100 ml, on a vérifié par électrophorèse suivie d'autoradiographie que la capacité de saturation n'était pas dépassée.

permet le décrochage de la cellule de la molécule qui a cédé son métal et son remplacement par une molécule chargée. Sur le plan pratique la corrélation entre sidérémie et taux de fixation cellulaire du fer explique l'insuffisance de synthèse d'hémoglobine malgré l'hyperplasie érythropoïètique dans les grandes hyposidérémies (63, 133) et la rapidité de la guérison dès que le traitement permet de relever la saturation en fer du compartiment de transport.

3) Mécanisme et régulation de la fixation globulaire du fer

Les observations faites in vivo ont montré que le fer lié à la sidérophiline est la voie normale par laquelle le fer est fourni à l'organisme, que la sidérophiline n'est pas consommée (8,69, 112), et que malgré la stabilité du complexe fer-transferrine (environ 10^{29}-77-) la cellule rouge peut utiliser très vite le fer du transporteur puisque la période de renouvellement peut être aussi faible que 10 minutes dans les hyposidérémies importantes.

Le mécanisme de la fixation de fer aux cellules rouges à partir de la sidérophiline se prête à l'étude in vitro, puisqu'on a montré depuis 1949 qu'une fixation de radiofer aux réticulocytes se fait dans ces conditions (152); ce travail doit cependant éviter l'usage du sang des oiseaux, où le mécanisme de transport de fer est différent (116), et doit tenir compte chez les mammifères d'une certaine spécificité d'espèce de la sidérophiline (111); mais, chez l'homme, les différentes transferrines identifiées par électrophorèse ont la même capacité à fixer le fer et à le relâcher au profit des cellules utilisatrices (147).

La fixation du fer au réticulocyte in vitro est beaucoup plus élevée sur les cellules intactes que sur les membranes des cellules lysées. Le taux de fixation par heure s'infléchit lorsque l'incubation se prolonge, alors qu'il est à peu près stable pendant les trois premières heures (9,68,98,103). La fixation est à son optimum à une température de 37 degrés centigrades et à un pH de 7,6 (68,103).

a) La fixation globulaire du fer dépend de récepteur cellulaire.

Alors que la fixation de fer ionique n'est pas ou peu augmentée quand le pourcentage des cellules immatures dans le culot globulaire est augmenté, la fixation de fer à partir de la transferrine est proportionnelle au taux des réticulocytes ;

Tableau 7

PENETRATION GLOBULAIRE DU FER A PARTIR D'UN MEME PLASMA ADDITIONNE DE FER NON RADIO-ACTIF

Sidérémie - même plasma additionné de quantité variable de sulfate ferreux -	130 γ/100 ml	230 γ/100 ml	330 γ/100 ml
Fixation globulaire (en 10^{-3} γ pour 10^7 réticulocytes)	$0.85.10^{-3}$	$1.36.10^{-3}$	$1.90.10^{-3}$
Synthèse héminique (en 10^{-3} γ de fer pour 10^{-7} réticulocytes)	$0.20.10^{-3}$	$0.23.10^{-3}$	$0.18.10^{-3}$

Tableau 8

INHIBITION DE LA FIXATION DU FER A DES RETICULOCYTES DE RAT PAR LE CYANURE DE POTASSIUM (Molarité : 1.10^{-3} entraînant un blocage complet de la synthèse héminique)

Temps d'incubation en présence de plasma marqué et de CNK	Taux de fixation du fer en coups/mn/ml de culot cellulaire		Pourcentage d'inhibition de la fixation du fer
	témoin	expérience/CNK)	
5 minutes	848	727	14
10 minutes	1.312	1.095	17
15 minutes	2.040	1.545	24
1 heure	4.357	3.050	30
2 heures 35 minutes	6.763	4.571	32,5
3 heures 20 minutes	8.323	5.434	34,5
4 heures 20 minutes	9.507	5.501	42
6 heures 20 minutes	12.810	7.020	44,5

cette proportionnalité n'est cependant pas si rigoureuse qu'elle a été décrite (68), parce que lorsque la réticulocytose s'élève la jeunesse relative des réticulocytes augmente. Le réticulocyte âgé fixe du fer en quantité unitaire plus faible que le réticulocyte jeune, de même que celui-ci fixe du fer à un taux un peu moindre (40,104,141) ou nettement moindre (4,98) que l'érythroblaste. La diminution de la fixation de fer à la cellule vieillie peut être due à plusieurs causes : diminution du métabolisme énergétique, disparition des sites actifs de la membrane, saturation de ces sites par non-utilisation du métal.

La première hypothèse s'appuie sur des faits indiquant que la fixation de fer requiert de l'énergie. Elle est en effet dépendante de la température (le rapport de fixation à 37 et 25°C étant toujours le même pour des réticulocytes âgés - culot globulaire normal - des réticulocytes jeunes - animal saigné - des normoblastes - suspension de moelle -) L'adjonction de glucose au milieu active la fixation de fer, les inhibiteurs du catabolisme glucidique la diminuent (68). Sur des tranches de foie il y a parallèlisme entre la fixation de fer et l'activité de synthèse d'ATP des mitochondries (96). Dans des lysats de moelle, la synthèse d'hème et la fixation de fer sont bloqués, mais l'adjonction d'ATP peut restaurer la fixation du fer, sans restaurer la synthèse héminique (95).

Cependant les inhibiteurs tels que le fluorure et l'iodure de sodium, le cyanure de potassium, le 2-4 dinitrophénol, la L -thyroxine ne nous ont pas montré d'inhibition importante de la fixation de fer, à des doses qui cependant bloquent le métabolisme oxydatif générateur d'énergie; l'incubation de réticulocytes en présence d'ouabaïne (10^{-3}M) n'inhibe pas la fixation globulaire du fer; l'inhibition partielle observée avec CNK et dinitrophénol peut être due au blocage de l'utilisation héminique, saturant ainsi secondairement le récepteur cellulaire. L'expérience indiquée sur le tableau 8 est en faveur de cette hypothèse; les réticulocytes de rat, incubant en présence de CNK à une molarité bloquant totalement la synthèse d'hème, fixent le fer à un taux de plus en plus faible par rapport au témoin au fur et à mesure du temps.

D'autres auteurs ont aussi observé que la fixation de fer n'est pas abolie par divers inhibiteurs enzymatiques, aussi bien dans les cellules muqueuses intestinales (24), les cellules hépatiques (27,95), que les érythroblastes (95) ou les réticulocytes (28,70,101).

Il est donc possible, contrairement à l'opinion de JANDL, que la fixation du fer dépende d'une fourniture d'énergie, non pas pour le processus d'échange de fer de la transferrine à la cellule, mais pour la mobilisation ultérieure de ce fer fixé. D'autre part, on doit noter que toute fixation de fer disparaît dans la cellule mûre, dont le catabolisme glucidique a diminué mais n'a pas disparu, et qui continue à synthètiser l'ATP nécessaire au maintien de son équilibre hydro-électrolytique. Ce n'est donc pas un défaut d'énergie qui règle la fixation de fer en fonction de l'âge de la cellule.

Il paraît logique de penser que l'utilisation du fer pour la synthèse d'hème est l'élément direct du taux de fixation. Les expériences indiquées plus tard ont prouvé une relative indépendance des deux phénomènes, au moins pendant quelques heures; le réticulocyte peut donc fixer du fer, et le mettre en réserve sans l'utiliser. De même on a montré (104) que la cellule déjà âgée cesse de fixer alors qu'elle synthétise encore l'hème, à partir de glycine-C 14 venue du milieu extérieur, mais à partir de fer préalablement fixé comme réserve. La cellule peut donc fixer du fer et ne l'utiliser qu'en partie, ou de façon différée : il existe donc un compartiment de réserve, en plus du fer de la membrane et du fer héminique, susceptible de se gonfler et de se dégonfler selon les besoins. Les expériences développées dans les chapitres suivants montrent que cette mise en réserve est un phénomène actif, et ne se voit pas simplement quand la synthèse d'hème est inhibée; environ la moitié du fer fixé suit cette voie d'utilisation détournée. Il est intéressant de noter que les agents qui bloquent complètement toute synthèse héminique (comme par exemple le CNK - tableau 8) diminuent d'environ 50 % la fixation du fer.

On peut donc admettre qu'à court terme le taux de synthèse d'hème régularise le flux de fer gagnant l'hème par la voie directe à partir de la membrane. Le mouvement de fer, de la membrane aux réserves, n'est au début pas influencé et la fixation n'est donc inhibée que partiellement par une suppression de l'utilisation.

Le taux de fixation, ne dépendant que peu de la fourniture d'énergie, que partiellement de l'utilisation pour l'hème, pourrait dépendre de l'altération progressive des sites actifs de la membrane avec le vieillissement (68). Cette hypothèse a pour elle le fait qu'une cellule vieillie, qui ne fixe pas le fer, ne fixe pas non plus la transferrine marquée par l'iode 131 (69). Mais on a montré plus haut que la fixation de la protéine dépend en fait de la fixation du métal et non l'inverse; ainsi, lorsque le

site actif de la membrane est saturé en fer, la fixation est inhibée. Une expérience comparant le taux de fixation de fer (103) et de transferrine (69) sur des cellules normales et des cellules préalablement "désaturées" par incubation en sérum salin a montré que la fixation de ces deux éléments, fer et protéine, était plus élevée dans le second culot que dans le premier. Ceci est observé aussi bien pour des cellules très jeunes (érythroblastes) que pour des réticulocytes déjà âgés (culot humain normal). Il n'y a ainsi aucune preuve qu'une altération progressive de la membrane empêche la fixation de transferrine et le transfert de fer à la cellule.

Il semble que le facteur régulateur soit le degré de réplétion en fer du site actif de la membrane. Les expériences précédentes le prouvent, de même que le taux élevé de fixation de fer à partir d'un plasma normal sur le réticulocyte d'anémie hypochrome, par rapport au réticulocyte d'anémie hémolytique (104). L'accélération simultanée de la fixation de la protéine et de fer quand le récepteur est désaturé peut être dû à l'augmentation du nombre des sites fonctionnellement actifs sur la membrane, mais aussi à l'accélération du transfert du métal de la protéine à la membrane avec un "turnover" accéléré de la protéine chargée de fer.

On peut donc actuellement conclure que le taux de fixation de fer à partir d'un plasma dépend de la vacuité du récepteur cellulaire. Cette vacuité dépend à son tour du taux d'utilisation pour l'hème et aussi du taux de mobilisation de fer vers une réserve. Ainsi la fixation de métal n'est-elle pas immédiatement dépendante du degré d'utilisation héminique; l'existence de la réserve permet une fixation diminuée, mais persistante, pendant que la synthèse est arrêtée; et à l'inverse elle permet une poursuite de la synthèse quand la fixation est diminuée ou supprimée. L'arrêt de toute fixation, aussi bien de protéine que de fer, dans l'hématie mûre parait du au blocage du mouvement du fer à partir du récepteur vers la réserve comme vers le compartiment d'utilisation, aboutissant à la saturation du récepteur qui devient incapable de fixation de transferrine.

b) La fixation globulaire du fer dépend de la saturation en fer du transporteur plasmatique.

La fixation de transferrine et de fer dépend donc en premier lieu du récepteur. Mais cette fixation dépend aussi du milieu extérieur, c'est-à-dire du plasma.

La fixation du fer aux réticulocytes est fonction de la concentration en fer du milieu, comme JANDL (68) et nous-même (103), puis MORGAN (101), l'ont montré. Nous n'avons cependant pas observé de courbe du type de celle de JANDL (68) suggérant qu'au delà d'une saturation de 60 % le fer est fixé de façon non spécifique aux cellules mûres, c'est-à-dire capable d'en être éliminé par les lavages successifs et incapable d'être utilisé pour la synthèse héminique; ce phénomène paraît en réalité dû à une mauvaise fixation de l'atome radioactif à la protéine proche de sa saturation (72).

Nous avons pu vérifier que cette fixation augmentant en fonction de la sidérémie n'était pas due à une erreur technique (liaison de moins en moins stable du fer radioactif à une transferrine de plus en plus saturée); en effet, si on marque un plasma de grande hyposidérémie et que, dans un second temps, on le fractionne en plusieurs échantillons qu'on sature alors de plus en plus avec une solution de sulfate ferreux non marqué, on constate que la fixation de fer au culot cellulaire (exprimée en poids, et non en pourcentage) augmente avec la saturation, comme dans les expériences précédentes; or, dans ce cas, l'atome de fer marqué est toujours le premier fixé à la transferrine; si l'augmentation de transfert du métal à la cellule était due seulement à une fixation instable du fer sur la protéine prête d'être saturée, le phénomène ne jouerait dans cette expérience que sur des atomes non marqués, et non sur les atomes de fer radioactif. Utilisant une transferrine marquée par radio-iode, JANDL et KATZ (69) ont observé une fixation à la fois plus rapide et plus forte de la protéine saturée en fer que la protéine non saturée; au contraire, MORGAN et LAURELL (101) observaient que l'augmentation de la concentration en fer dans le plasma vecteur augmentait la fixation cellulaire du radio-fer, mais n'augmentait pas la fixation de la protéine marquée à l'iode. On retrouve ici la même incertitude que plus haut : la régulation de la fourniture de fer à la cellule se fait-elle en accélérant le mouvement de la protéine transportrice ou en accélérant la vitesse avec laquelle la cellule lui prend son métal ?

L'augmentation de la concentration de transferrine - à une saturation en fer égale - augmente la fixation cellulaire du fer comme ceci a été montré dans les deux premières expériences du tableau 4; elle augmenterait aussi la fixation de la protéine elle-même (101). Ceci pourrait améliorer la fixation globulaire de fer dans le cas des hyposidérémies, où la saturation en fer est diminuée, mais où la concentration en transferrine est

augmentée. C'est peut-être un phénomène du même ordre (augmentation du nombre de molécules de transferrine disponibles) qui explique que la fixation de fer, exprimée en poids, augmente lorsqu'on augmente la quantité de plasma dans la fiole d'incubation, la concentration en protéine et la saturation de celle-ci en fer restant par ailleurs constante.

c) Existe-t-il une action spécifique du plasma, autre que la saturation en fer de la protéine de transport, capable de régler la fixation globulaire de fer ?

L'utilisation in vitro de plasma obtenu dans diverses conditions pathologiques a permis d'observer de nettes variations de la fixation du fer à un même culot globulaire selon la provenance du plasma. Mais ce fait, dans presque tous les cas, est explicable par la seule variation de la saturation en fer de la transferrine. Bien qu'on tende maintenant à penser que l'érythropoïétine plasmatique peut avoir une action sur la synthèse des ribo-nucléoprotéines, et donc indirectement sur la synthèse héminique et l'utilisation du fer (140), il est peu probable que cette hormone agisse directement sur la fixation de fer par les réticulocytes. In vitro la stimulation de la fixation de radiofer par les érythroblastes ne s'observe en présence d'un plasma riche en érythropoïètine qu'au bout de 24 heures (39), c'est-à-dire à un moment où les cellules ont eu le temps de se multiplier; l'érythropoïétine, dans ce système, n'agirait donc selon ERSLEV qu'en augmentant la population cellulaire érythroblastique capable d'utiliser du fer, et non pas en augmentant la synthèse héminique par cellule. Les travaux qui montrent une augmentation de la fixation de fer aux réticulocytes in vitro en présence d'érythropoïétine ne sont pas à l'abri de la critique (107); ceux qui mesurent l'incorporation héminique de la glycine-C 14 sont plus rigoureux, mais divergent dans leurs conclusions; pour les uns l'érythropoïètine active la synthèse de l'hème in vitro (108,121) et pour d'autres elle est sans activité (142). Le rôle direct de l'érythropoïtine, ou d'un quelconque facteur plasmatique présent chez les sujets anémiques sur la fixation du fer et la synthèse d'hème est donc actuellement très douteux et mérite la poursuite des recherches.

4) Conclusion

L'étude de la régulation de la fixation globulaire du fer à partir d'un plasma marqué aboutit aux conclusions suivantes :

- Le fer doit être apporté lié à la protéine spécifique de transport.

- La plus ou moins grande saturation en fer de la protéine conditionne la plus ou moins grande fixation de fer à la cellule. L'augmentation du rapport volume de plasma/volume des cellules réceptrices augmente aussi la fixation de fer. Aucune preuve ne peut être actuellement donnée de l'activité propre de l'érythropoïétine sur le phénomène de la fixation globulaire du fer in vitro.

- La fixation de fer à la cellule nécessite la fourniture d'énergie mais probablement uniquement parce que celle-ci conditionne l'utilisation du fer fixé : la suppression de la fourniture énergétique arrête toute l'utilisation de fer, mais ralentit seulement sa fixation.

- Le fer fixé est en partie utilisé directement pour la synthèse héminique, en partie stocké comme réserve temporaire; le blocage de synthèse héminique n'entraîne donc qu'une inhibition partielle de la fixation cellulaire de fer.

- La fixation est stoppée quand tout mouvement à partir de la membrane est supprimé; cette suppression totale de la mobilisation du fer amènerait une saturation en fer du récepteur cellulaire, par conséquent incapable d'accepter des liaisons supplémentaires avec la transferrine.

- C'est le rapport de la saturation du récepteur cellulaire (indirectement liée à l'utilisation du fer par la cellule à partir de ce récepteur) à la saturation du transporteur plasmatique qui règle le taux de la fixation globulaire de fer.

Chapitre 3

ETUDE QUANTITATIVE DE LA CINETIQUE DU FER DANS LE RETICULOCYTE ET L'ERYTHROBLASTE NORMAUX ET PATHOLOGIQUES IN VITRO

I - QUANTITE REELLE D'HEME SYNTHETISEE PAR LES RETICULOCYTES ET LES ERYTHROBLASTES NORMAUX "IN VITRO"

La quantité d'hème synthétisée de novo à partir du fer plasmatique n'est pas égale à la quantité réelle d'hème synthétisée pendant le même temps. Elle est toujours inférieure, à cause de l'utilisation par la cellule d'une certaine quantité de fer présente antérieurement dans celle-ci. Cette quantité de fer "endogène" utilisée peut être mesurée en comparant la synthèse réelle d'hème et la synthèse d'hème effectuée à partir du fer "exogène". On a par conséquent cherché à mesurer la synthèse exacte d'hémoglobine par la cellule intacte in vitro.

a) Etude de la synthèse hémoglobine à partir de l'acide delta-amino-lévulinique.

La synthèse réelle d'hème pourrait être théoriquement mesurée à partir de l'utilisation de l'acide delta-amino-lévulinique (ALA). Cette mesure aurait un avantage important, celui de ne pas faire intervenir la dilution isotopique, puisque la quantité de précurseurs de l'hème non marqués présents dans le réticulocyte est faible (49, 159); ce problème de dilution isotopique a été étudié par VAVRA et coll. (149) qui ont montré que l'activité isotopique de l'ALA ne diminuait pratiquement pas lorsqu'on le mettait en suspension dans un hémolysat de globules rouges, ce qui prouve que ce facteur de correction peut être négligé dans les calculs. On pense que l'ALA pénètre mal dans les cellules (132, 149) mais ceci n'a pas été observé dans nos expériences; d'ailleurs les résultats quantitatifs de synthèse héminique obtenus par le calcul ne changent pas s'il entre dans la cellule intacte une quantité d'ALA suffisante pour la faible quantité d'hémoglobine qui est synthétisée par les réticulocytes in vitro.

Des objections très importantes doivent cependant être apportées à ce mode de calcul.

La quantité d'hème néoformée à partir d'ALA ne représente la quantité réelle d'hème néoformée que si la synthèse d'hème à partir de la glycine non marquée du réticulocyte est bloquée. Effectivement, des expériences montrent qu'il existe une relation inverse entre l'utilisation héminique de la glycine et de l'ALA; cette dernière s'abaisse lorsque l'utilisation de la glycine est augmentée par utilisation d'un réducteur (par exemple la cystéine -SH, comme indiqué sur le tableau 9), et augmente lorsque l'utilisation de la glycine est réduite par l'effet d'un inhibiteur (par exemple le mono-iodo-acétate, comme indiqué sur le tableau 10). D'autre part, après d'autres auteurs (2,150) nous avons observé que l'utilisation de la glycine C 14 était inhibée de façon progressive par adjonction de quantités progressives d'ALA non radioactif au milieu. Mais cette inhibition n'est jamais absolument complète, ce qui fausse donc par défaut le calcul de la quantité réelle d'hème synthétisée.

Tableau 9

EVOLUTION RECIPROQUE DE L'UTILISATION HEMINIQUE DE LA GLYCINE - 2 - C 14 et de l'ALA - 4 - C 14 PAR UN CULOT GLOBULAIRE HUMAIN NORMAL "IN VITRO", EN PRESENCE DE CYSTEINE - SH

Milieu d'incubation	Synthèse hémoglobinique calculée à partir de la glycine ($10^{-3}\gamma/10^7$ rét.) (1)	Synthèse hémoglobinique calculée à partir de l'ALA (2) ($10^{-3}\gamma/10^7$ rét.) (1)
Sérum physiologique	302	246
Sérum physiologique + Cystéine SH $0,2 . 10^{-3}$ M	525	222
Sérum physiologique + Cystéine SH $0,5 . 10^{-3}$ M	895	210
Sérum physiologique + Cystéine SH $1. 10^{-3}$ M	1165	148
Sérum physiologique + Cystéine SH $2. 10^{-3}$ M	1270	94
Sérum physiologique + Cystéine SH $5. 10^{-3}$ M	320	134

(1) - La pénétration de la glycine et de l'ALA n'était pas modifiée par la cystéine.
(2) - ALA radioactif + glycine non marquée

Une deuxième objection est la suivante : une partie de l'ALA ayant pénétré dans la cellule peut être dégradée et son atome de C^{14} réutilisé pour la synthèse par l'intermédiaire du cycle de KREBS, avec une dilution isotopique qu'on ne peut calculer.

La troisième objection est la suivante. Certains auteurs admettent que l'étape biochimique limitant la synthèse d'hème est la première de toutes les réactions, celle commandée par l'ALA-synthétase : glycine + succinate → ALA (55); la surcharge d'un milieu acellulaire en porphyrines bloque cette étape enzymatique; l'activité de l'ALA-synthétase disparait la première dans les cellules qui vieillissent, alors que ces mêmes cellules conservent un équipement permettant de synthétiser des porphyrines à partir d'ALA (124). Ainsi la fourniture d'ALA à un culot globulaire permettrait :

- d'une part à des cellules déjà mûres de synthétiser de l'hème, alors qu'elles ne peuvent plus le faire dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire à partir de glycine;
- d'autre part à des cellules jeunes de synthétiser plus d'hème qu'elles ne sauraient le faire à partir de glycine, puisque l'étape limitante est outrepassée.

Diverses expériences ont été faites, qui confirment ces deux déductions, et permettent par conséquent de réfuter toute conclusion sur la quantité d'hème synthétisée in vitro à partir d'ALA marqué. Il n'y a pas de net parallélisme entre le taux de synthèse d'hème à partir de l'ALA et le taux de la réticulocytose, alors qu'il y en a un entre la réticulocytose et le taux d'utilisation de la glycine. Le fer radio-actif est mieux utilisé à partir d'un culot cellulaire incubant en présence d'ALA et de glycine qu'en présence de glycine seule; ceci avait aussi été observé en ce qui concerne la synthèse de l'hème dans des culots globulaires et des hémolysats de sang d'oiseau (149) et dans des expériences étudiant la synthèse de la myoglobine in vitro (115). Enfin, la synthèse de novo est augmentée de façon progressive par l'adjonction de quantités progressives d'ALA, le plateau de synthèse n'étant atteint que tardivement. Ces faits sont indiqués sur le tableau 10.

Tableau 10

L'adjonction au milieu de quantités croissantes d'ALA augmente l'utilisation du fer plasmatique, et augmente la synthèse réelle d'hème à partir d'ALA marqué. D'autre part le chiffre d'hémoglobine synthétisée à partir d'ALA est considérablement plus élevé que celui synthétisé à partir du radio-fer plasmatique.

(culot globulaire = sang périphérique de lapin normal. Réticulocytose 3 %)

Milieu utilisé	Fixation globulaire de fer (10^{-3} γ/10^7 rétic.)	Synthèse hémoglobinique à partir du fer plasmatique (10^{-3} γ/10^7 rétic.)	Fixation globulaire d'ALA (10^{-3} γ/10^7 rétic.)	Synthèse hémoglobinique à partir d'ALA (10^{-3} γ/10^7 réticu.)
Plasma	0,66	21,1		
Plasma + ALA 10 γ	0,67	25,4	65	320
Plasma + ALA 20 γ	0,66	28,3	105	700
Plasma + ALA 40 γ	0,68	31,5	260	1100
Plasma + ALA 100 γ	0,69	36	535	1750
Plasma + ALA 150 γ	0,67	40,5	715	2220
Plasma + ALA 200 γ	0,70	44	705	2400

Dans ces conditions les chiffres de synthèse mesurée in vitro à partir d'ALA marqué ont peu de signification; il suffit de noter qu'avec un culot globulaire d'homme normal on a trouvé une synthèse hémoglobinique de 310 - 10^{-3} γ pour 10^7 réticulocytes en 3 heures, en présence de 33 γ d'ALA dans le milieu d'incubation (écart-type 170-10^{-3}), et de 2350-10^{-3} γ pour 10^7 réticulocytes en présence de 150 γ d'ALA dans le milieu (écart-type 1350-10^{-3}). Ces chiffres se comparent avec un taux de synthèse de l'ordre de 150,10^{-3} γ d'hémoglobine pour 10^7 réticylocytes en 3 heures à partir de glycine C 14.

Le travail fait avec l'acide delta-amino-lévulinique permet donc seulement d'aboutir aux conclusions physiologiques suivantes. L'acide delta-amino-lévulinique pénètre à un taux élevé dans le réticulocyte mais aussi dans les cellules plus mûres. Il est utilisé pour la synthèse de l'hème préférentiellement à la glycine. Il entraine une synthèse d'hème de novo supérieure à celle que peut réaliser le réticulocyte avec la seule glycine, l'étape glycine + succinate → ALA étant donc bien celle limitant la synthèse d'hème; selon certains, cette étape capitale serait régularisée par le taux d'hémine formée (26), mais non par le taux de fer disponible pour la synthèse des porphyrines. Par contre, on ne peut pas chiffrer par ce moyen la synthèse d'hémoglobine physiologique; le taux calculé est certainement excessif du fait du déclenchement d'une synthèse anormale, puisque dans les conditions physiologiques le matériel n'est fourni qu'en quantités limitées.

b) Etude de la synthèse d'hémoglobine à partir de la glycine

Les mesures de synthèse héminique in vitro faites dans les mêmes conditions à l'aide de glycine 2 C 14 soulèvent une autre difficulté. Il est nécessaire, dans ces cas, de tenir compte de la présence d'un pool de glycine intracellulaire qui contribue à la synthèse d'hème.

La glycine pénètre très aisément dans les cellules rouges, à un taux de 10 à 30 % des 20 γ de glycine ajoutés au plasma, dans les 3 heures de l'épreuve. Cette pénétration se fait surtout dans les réticulocytes mais pas exclusivement; il n'y a pas en effet de parallélisme rigoureux entre le taux de la réticulocytose et le taux de la fixation globulaire de la glycine. Un exemple est donné dans le tableau 11. Il existe par contre une corrélation étroite entre le taux de la réticulocytose et l'incorporation hémoglobinique de la glycine 2-C 14, comme le montre le tableau 11. Cette corrélation est observée pour les réticulocytes d'hom-

me, de lapin, de rat. Ces deux observations prouvent que la glycine est utilisée par toutes les cellules rouges à divers métabolismes, mais à la synthèse héminique seulement par le réticulocyte.

Pour le calcul de la synthèse de novo d'hème à partir de la glycine, la dilution isotopique du traceur doit être considérée, mais seulement dans le pool cellulaire des réticulocytes. On connaît bien le taux de glycine des globules rouges en général (10,20), d'environ 15-20 γ/ml chez l'homme, d'environ 60 γ/ml chez le lapin. On connaît moins celui des réticulocytes; d'après les chiffres de ALLEN (1), ce compartiement pourrait être de plus grand volume, puisque cet auteur a observé un taux de 150 γ/ml chez un sujet ayant une grande hémolyse avec plus de 50 % de réticulocytes. Deux autres inconnues existent en outre: toute la glycine dosée chimiquement dans le globule rouge fait-elle partie du pool métabolique utilisable pour l'hème ? Doit-on considérer, à cause de la facilité de conversion sérine-glycine (130, 168) que le pool métabolique de la glycine doit être augmenté de celui de la sérine ?

Nous avons mesuré le pool dynamique de la glycine intraglobulaire en étudiant la synthèse d'hème par un culot globulaire mis en présence d'une faible quantité de glycine marquée, ou de celle-ci et d'une quantité de plus en plus grande de glycine non marquée. Dans ces différentes conditions, si le pool intra-cellulaire est nul, le taux d'activité utilisé pour la synthèse est une droite fonction de la seule quantité de glycine extérieure; s'il y a un pool métabolique intra-cellulaire de glycine, le pourcentage de glycine utilisé n'est pas proportionnel à la quantité pondérale de glycine du milieu. Il ne s'agit bien entendu que de la glycine des cellules qui synthétisent l'hème, c'est-à-dire les réticucolytes. On peut ainsi calculer le pool métabolique intracellulaire de la glycine qui était chez le rat normal très faible, de l'ordre de quelques gammas seulement par ml de culot cellulaire (réticulocytose de ces animaux : 3 %). Chez l'homme normal (réticulocytose : 1 %), ce pool est d'environ 0.5-1.5 γ/ml de culot globulaire.

Nous avons estimé grossièrement dans nos calculs le compartiment de dilution à 50 γ/1 ml de réticulocytes (ce sont les seules cellules qui nous intéressent pour l'étude de la synthèse de l'hème); dans les calculs on utilisait le chiffre de 50 γ, corrigé par le volume du culot globulaire en ml et par le pourcentage des réticulocytes.

Tableau 11

CORRELATION ENTRE LE TAUX DE LA RETICULOCYTOSE ET LA PENETRATION GLOBULAIRE DE LA GLYCINE D'UNE PART, LA SYNTHESE HEMINIQUE A PARTIR DE LA GLYCINE D'AUTRE PART

Culot globulaire (1ml de culot glob. : env. 800.10^7 cel.)	Fixation globulaire de glycine (c/p/m) - en parenthèses, valeur rapportée à un même nombre de réticulocytes (10^7)		Utilisation héminique de la glycine (c/p/m après corrections) - en parenthèses, valeur pour 10^7 réticulocytes -	
10.10^7 réticulocytes témoin)	9200	(920)	42	(4,2)
20.10^7 réticulocytes (anémie hypochrome traitée)	11280	(564)	84	(4,2)
230.10^7 réticulocytes (sphérocytose héréditaire)	17200	(75)	1095	(4,8)

Dans ces conditions de calcul, la synthèse d'hémoglobine de novo, au cours d'une incubation de 3 heures, à partir de la glycine du plasma (glycine marquée + glycine du plasma) ou à partir de la glycine du sérum physiologique (glycine marquée seulement), était assez homogène chez les sujets normaux témoins. Chez l'homme (31 explorations), la moyenne était de 136.10^{-3} $\gamma/10^7$ réticulocytes; chez un seul sujet, ayant subi en 2 ans 27 explorations par cette méthode, la moyenne était de $131.10^{-3}\gamma/10^7$ réticulocytes. Chez la femme (15 explorations), la moyenne était exactement la même, 136.10^{-3} $\gamma/10^7$ réticulocytes. L'écart-type de la moyenne est assez important (76.10^{-3} chez l'homme, 59.10^{-3} chez la femme, 69.10^{-3} sur le total des résultats). Ce fait est probablement dû à des modifications techniques mineures d'une expérience à l'autre, inévitables lorsqu'on veut comparer entre eux des résultats accumulés sur

plus de 2 ans; le fait que la variation dans un sens ou dans l'autre par rapport à la moyenne des résultats se fait dans le même sens pour le culot normal et le culot pathologique testés le même jour prouve bien que ces variations sont liées à des conditions techniques; on peut d'ailleurs noter que le taux de synthèse d'hème in vitro, calculé par réticulocyte d'après le travail de BANNERMAN, est lui aussi variable d'une expérience à l'autre dans d'assez larges proportions (9). Dans les conditions adoptées, cette synthèse est d'environ 1 millimicro-mole d'hème pour 10^{-9} réticulocytes en 3 heures d'incubation, chiffre voisin de la moyenne des résultats publiés par BANNERMAN pour quelques anémies hémolytiques (9). Dans les faits de VAVRA et coll., le chiffre de synthèse d'hème, pour 10^{9} réticulocytes normaux après une incubation de 4 heures est assez variable entre 0,20 et 1,5 millimicro-mole, donc également voisin des nôtres (149).

Il nous paraît donc possible d'apporter les conclusions suivantes. On peut considérer la synthèse de novo d'hème réalisée in vitro à partir de la glycine comme une mesure de la synthèse réelle : le chiffre de synthèse mesuré à partir de la glycine pourra donc être comparé au chiffre de synthèse à partir du fer plasmatique pour mettre en évidence dans ce dernier cas l'éventuelle dilution du traceur plasmatique dans un compartiment intra-cellulaire non marqué pré-existant et calculer la taille de ce compartiment. Le taux de la réticulocytose, donc dans une certaine mesure la jeunesse des réticulocytes ne modifie pas le taux de la synthèse d'hème exprimé par cellule immature : il est donc possible de comparer les chiffres de synthèse d'hème obtenus chez des sujets différant par leur taux de réticulocytes, s'ils sont explorés au même moment dans les mêmes conditions.

II - COMPARAISON ENTRE LE TAUX DE LA SYNTHESE D'HEME ET LE TAUX DE LA SYNTHESE D'HEME A PARTIR DU FER PLASMATIQUE

La comparaison des deux chiffres calculés pour la synthèse d'hème par réticulocyte, selon qu'on mesure l'utilisation du fer marqué (fer plasmatique) ou celle de la glycine est très instructive. Il existe une nette différence entre les deux chiffres, mais cette différence varie selon qu'on utilise comme substrat des réticulocytes jeunes ou vieux, des réticulocytes normaux ou de sujets porteurs d'une érythropathie. Des exemples de ces différences sont donnés sur le tableau 12

Tableau 12

DIFFERENCES ENTRE LE TAUX DE SYNTHESE D'HEME A PARTIR DU FER EXTERIEUR ET A PARTIR DE LA GLYCINE

(Chacun des résultats indiqués est la moyenne de dix mesures de la synthèse in vitro pendant 3 heures en présence d'un plasma normal marqué).

	Synthèse d'hème calculée à partir *	
	du fer plasmatique	de la glycine
Réticulocytes âgés (homme normal)	1,4	64
Réticulocytes jeunes (homme porteur d'une sphérochrome héréditaire)	79	89
Réticulocytes d'anémie hypochrome hyposidérémique	51	69
Réticulocytes d'anémie hypochrome hypersidérémique (thalassémie majeure)	40,5	87

* Valeurs mesurées en 10^{-3} γ d'hémoglobine / 10^{7} réticulocytes en trois heures.

Plusieurs explications peuvent être données à la différence du taux de synthèse héminique vraie (mesuré à partir de la glycine -2-C 14) avec le taux de synthèse apparente calculée à partir du fer du plasma. La première est que, dans les cellules circulantes, le mouvement du fer à partir du récepteur de la membrane est stoppé ou du moins nettement diminué, et que la synthèse se fait à partir du fer endo-cellulaire. La seconde est que le fer plasmatique marqué pénètre et se dilue dans un pool endo-cellulaire avant d'être utilisé.

La première hypothèse s'appuie sur les constatations expérimentales suivantes :

- Le taux de synthèse calculé à partir du fer plasmatique n'atteint jamais la valeur calculée à partir de la glycine - C 14 même pour des incubations in vitro durant 24 ou 36 heures.

- Plus les cellules périphériques sont âgées (érythroblastes, réticulocytes d'animal saigné ou d'anémie hémolytique humaine, réticulocyte normal d'homme ou d'animal en équilibre), plus la différence est nette entre le taux de synthèse apparente calculée à partir du radio-fer du plasma et à partir de la glycine.

Cette explication ne suffit cependant pas, et l'existence d'une dilution du fer dans un pool intermédiaire intra-cellulaire est prouvée par les observations suivantes :

- Même dans un culot de cellules médullaires fraîches il existe une différence entre le taux de synthèse calculée à partir du fer et à partir de la glycine exogène.

- Après une heure d'incubation, si on poursuit celle-ci après lavage des cellules et remise en suspension dans un plasma neuf, on observe une augmentation progressive de la radioactivité présente dans l'hème.

- Le fractionnement cellulaire montre que le fer radioactif non héminique fixé n'est pas seulement sur le stroma, mais aussi dans le surnageant du lysat cellulaire. Dans les cellules les plus âgées, au contraire, le peu de fer fixé est presque uniquement sur les membranes.

- Des tentatives d'isolement par chromatographie d'un composé contenant du fer ont permis d'isoler une protéine définie par ses caractères d'élution sur Sephadex et DEAE - cellulose; son activité diminue comme augmente celle de l'hème lorsque la cellule après marquage est mise à incuber en plasma frais; cette protéine est endo-cellulaire. Cette observation, faite par nous-même et par d'autres (57, 127), nécessite un travail complémentaire pour l'identification de la protéine marquée, mais prouve du moins l'existence d'un compartiment métabolique intra-cellulaire, intermédiaire entre le fer extérieur et le fer de l'hème.

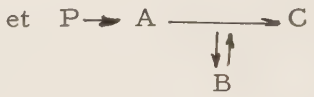
On peut donc conclure qu'il existe, entre le fer du plasma et le fer de l'hème, du fer sous forme liée à une protéine encore non définie (ou éventuellement à plusieurs protéines). L'existence de ce compartiment retarde l'utilisation pour l'hème du fer plasmatique. La mise en évidence de ce ou de ces compartiments intermédiaires, le calcul de leur volume et de leur vitesse de renouvellement feront l'objet des chapitres ultérieurs.

III - CINETIQUE DU FER IN VITRO DANS LE RETICULOCYTE NORMAL

Des modèles plus ou moins complexes des mouvements du fer dans la cellule rouge immature peuvent être construits. En supposant l'existence d'un seul compartiment deux modèles s'opposent :

$$P \longrightarrow A \longrightarrow B \longrightarrow C \qquad (1)$$

et



(2)

où
- P est le fer de la transferrine du plasma
- A est le fer du récepteur de la membrane
- B est le fer du compartiment intermédiaire
- C est le fer de l'hème

Ces schémas peuvent être compliqués, si B est susceptible (dans l'hypothèse 1) de revenir vers A, et si A est susceptible d'échange en retour avec le fer plasmatique P. Ils seraient encore plus complexes si B était en fait multiple, soit parce que le compartiment intermédiaire comporte du fer lié à plusieurs supports protéiques différents, soit parce que ce compartiment est localisé dans différentes structures intra-cellulaires d'où ils se mobiliserait avec des vitesses différentes; sur le plan cinétique, la conséquence serait d'ailleurs la même : dissociation de B en plusieurs pools différents B, B', B'' ...

L'étude du schéma métabolique intra-cellulaire a été fondée sur deux méthodes : mesure de la vitesse de disparition du fer radioactif non héminique après marquage bref et remise en incubation en plasma frais, mesure de l'activité non héminique

de diverses structures intra-cellulaires à divers temps de cette post-incubation.

Les cellules étaient mises en incubation dans un plasma marqué par le radio-fer 59, pendant un temps variable de 3 minutes à 3 heures selon les cas. Après un lavage rapide, on les faisait incuber de nouveau en milieu plasmatique frais. Pour diluer au maxima le fer radio-actif qui aurait pu persister non fixé aux cellules après lavage, ce plasma était abondant par rapport au culot cellulaire, et saturé en fer au préalable. Ce plasma était d'autre part marqué par la glycine - 2 C 14 pour mesurer la synthèse réelle d'hémoglobine se produisant pendant cette seconde phase.

Après incubation à 37 °C avec agitation mécanique, un échantillon cellulaire était prélevé, lavé, hémolysé et compté. Puis son activité proprement héminique était mesurée (corrigée de la façon habituelle pour le rendement de la cristallisation).

Dans certains cas les cellules isolées et lysées étaient fractionnées, soit simplement en stroma et surnageant, soit en stroma, mitochondries et microsomes, selon les techniques exposées plus haut (3,78). Dans ces fractions, on mesurait l'activité totale et l'activité héminique. On ne pouvait malheureusement pas exprimer le résultat (pour les mitochondries et les microsomes) en activité spécifique par rapport à la quantité d'azote protéique, du fait de la nécessité de cristalliser l'hème de ces échantillons; cependant l'isolement des fractions intra-cellulaires était fait dans les mêmes conditions pour chaque échantillon, et on peut penser que les variations de qualité de l'isolement sont faibles d'une expérience à l'autre.

1 - Echange de fer entre la cellule et le plasma

Les expériences initiales ont cherché à mettre en évidence ou à éliminer l'existence d'un mouvement de fer à partir de la cellule vers le plasma. Un tel mouvement expliquerait en effet un déficit apparent d'utilisation de fer extérieur; son existence aurait en outre une grande importance pour expliquer la cinétique globale du fer in vivo comme ceci sera développé dans la seconde partie de ce travail. Plusieurs auteurs ont cru observer un tel phénomène, son importance étant variable d'une expérience à une autre (101, 118). Au contraire notre expérimentation conduit à nier l'existence de cet échange ou du moins à lui donner une place très modeste dans la cinétique du fer.

a) Lorsqu'on marque in vitro des hématies humaines normales, pauvres en réticulocytes et fixant mal le fer, puis qu'on les lave et les fait incuber en plasma frais, on constate une perte de fer par les cellules vers le plasma, souvent importante, très variable d'une expérience à l'autre, mais très rapide (en quelques minutes); ultérieurement il n'y a plus aucune perte, alors même que l'activité non héminique de ces cellules est encore très importante. Ceci suggère très fortement la disparition de fer fixé de façon non spécifique et réversible aux cellules mûres, et plus ou moins mal éliminé par le lavage qui a précédé la post-incubation en plasma neuf.

b) Lorsqu'on utilise dans les mêmes conditions des réticulocytes jeunes et abondants (anémie hémolytique ou hémorragique humaine ou expérimentale), on n'observe aucune perte significative de fer dans la post-incubation; la perte observée est quantitativement égale à celle observée en utilisant un culot globulaire d'hématies mûres, alors que la fixation totale de fer est ici beaucoup plus élevée; le pourcentage de fer perdu, par rapport au fer fixé, est donc ici très faible.

c) Lorsqu'on utilise des réticulocytes de lapin, on peut noter que s'il y a une perte d'activité du culot globulaire elle est liée essentiellement à une hémolyse durant la post-incubation; l'hémolyse in vitro est en effet importante chez le lapin dont les hématies sont fragiles et supportent mal les manipulations; le fer qui a gagné le plasma est dans cette expérience en grosse partie sous forme héminique, et on sait bien que le fer de l'hème ne peut gagner le plasma sauf en cas de mort cellulaire.

d) En utilisant du sang humain ou du sang de rat après marquage in vivo, et en le faisant incuber après lavage dans du plasma frais, on n'observe aucune perte de fer à partir du culot globulaire, bien qu'au départ une partie de l'activité du culot globulaire est sous forme non héminique.

Tableau 13

ABSENCE DE MOUVEMENT DU FER A PARTIR DES CELLULES VERS LE PLASMA
(activité du culot cellulaire lavé mesuré en coups/mn)

	Activité du culot cellulaire après				
	2 lavages	3 lavages	4 lavages	5 lavages	6 lavages
sang humain normal (2 expériences)	243 280	216 249	218 233	218 222	210 232

	Activité du culot cellulaire après une post-incubation * de						
	0 mn	10 mn	20 mn	30 mn	40 mn	60 mn	120 mn
sang humain	80	66	64	61	62	68	64
normal (2 expériences)	112	80	78	82	74	82	80

	Activité du culot cellulaire après une post-incubation * de					
	0 mn	15 mn	30 mn	60 mn	90 mn	120 mn
sang humain avec forte réticulocytose (2 expériences)	3960 1665	3600 1685	3550 1655	3430 1610	3520 1655	3480 1640

	Activité du culot cellulaire après une incubation * de				
	0 mn	10 mn	20 mn	30 mn	40 mn
sang de rat après marquage in vivo	2100	2160	2120	2160	2180

* Post-incubation en plasma frais après deux lavages du culot globulaire marqué.

e) L'échange cellule → milieu extérieur est le même lorsque le milieu extérieur est constitué de plasma frais ou de solution saline isotonique. Cela prouve que l'éventuel échange n'est pas du à l'action de transferrine non saturée dans le milieu extérieur. Des faits chiffrés sont indiqués sur le tableau 13 bis.

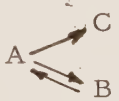
Tableau 13 bis

L'ECHANGE MODERE ET RAPIDE CELLULE PLASMA EST OBSERVE APRES INCUBATION EN PLASMA FRAIS ET EN SERUM SALIN
(sang de rat normal - incubation en plasma marqué pendant 10 minutes)

Temps d'incubation en milieu froid	0 mn	5 mn	10 mn	20 mn	30 mn	60 mn
Activité mesurée (en coups/mn) après incubation en plasma	161	138	140	143	141	134
Activité mesurée (en coups/mn) après incubation en sérum salin	168	139	132	132	132	-

2 - Evolution de la radioactivité non-héminique intra-cellulaire en fonction du temps d'incubation

De façon schématique, le choix existe entre deux modèles, mamillaire avec compartiment intermédiaire situé entre le fer de la membrane et le fer de l'hème (1). Les expériences précédentes permettent de ne pas tenir compte d'un éventuel mouvement du fer cellulaire vers le plasma.

1) 

2)

Les expériences présentées ci-dessous ont étudié l'activité non héminique totale, c'est-à-dire celle due aux deux pools A

et B; il n'est donc pas nécessaire de tenir compte d'un éventuel mouvement du fer de B vers A.

a) Constance de l'activité de synthèse réelle d'hème in vitro.

La courbe d'évolution de l'activité héminique due au fer radioactif n'a de signification que si la synthèse d'hème est constante pendant ce temps. Des expériences préliminaires ont vérifié ce fait; de la glycine -C 14 était ajoutée au plasma après la première incubation et le lavage du culot cellulaire, et l'activité héminique était mesurée en fonction du temps sur des échantillons successifs prélevés à intervalles réguliers.

Pendant les deux premières heures, la synthèse d'hème à partir de glycine -2 C 14 est régulière (fig. 1). Au delà de la 2ème heure, le taux de synthèse diminue, comme ceci a été aussi observé par d'autres (95); pendant cette période, l'interprétation des courbes d'utilisation de fer doit tenir compte de la baisse progressive de la synthèse réelle. Cette baisse de synthèse paraît au moins en partie liée à une acidification du milieu et peut être en partie corrigée par la remise en suspension en plasma neuf, ou simplement en ajustant régulièrement le pH.

b) Cinétique du fer radioactif non héminique.

La vitesse d'utilisation du radiofer dans la cellule immature permet de choisir entre les deux modèles possibles : modèle caténaire où le compartiment intermédiaire est "en série" dans la chaîne qui conduit du plasma à l'hème, modèle mamillaire où il est "en dérivation".

Le système caténaire impliquerait les conséquences suivantes :

- Dans les expériences de "post-incubation" en plasma frais, l'activité non héminique doit disparaître selon une exponentielle simple (pourvu que le taux de synthèse héminique par unité de temps soit constant, ce qui est le cas pendant les deux premières heures).

- Dans les mêmes conditions, l'incorporation héminique du radio-fer, calculée en pourcentage du fer fixé, se représente par une courbe sinusoïde en coordonnées cartésiennes : apparition d'abord lente, puis de plus en plus rapide de l'activité dans l'hème jusqu'à un point d'inflexion.

Au contraire, un système mamillaire aboutira aux observations suivantes :

- Courbe de disparition d'activité non héminique comportant deux pentes, rapide puis lente, selon le volume respectif des pools A et B et l'importance respective des flux A → C et A → B.

- Incorporation héminique du fer d'abord très rapide si A est de petite taille (mouvement direct A → C), puis incorporation ralentie correspondant à la remise à la disposition des mécanismes de synthèse du radio-fer ayant gagné B.

L'évolution de l'activité non héminique en fonction du temps a été étudiée sur des cellules immatures de tout âge (erythroblastes, réticulocytes jeunes, réticulocytes normaux circulants) chez l'homme, le lapin et le rat. Une série de résultats chiffrés sont indiqués sur le tableau 14. Les courbes de la fig. 2 montrent que la disparition de l'activité non héminique se fait normalement selon deux exponentielles, dont la première est très rapide. Cependant la courbe observée dans des réticulocytes humains normaux est d'interprétation discutable, parce que la quantité de fer fixé est faible et que de ce fait l'activité héminique mesurée est soumise à une erreur de comptage élevée. Dans la moelle incubée in vitro, le calcul de la radioactivité non-héminique est d'interprétation difficile, parce qu'on ignore quelle est la part de cette activité qui est érythroblastique ou non érythroblastique (cette dernière devant être exclue pour l'étude des compartiments intra-érythroblastique).

L'incorporation du fer à l'hème est d'emblée très rapide; après deux minutes d'incubation et un lavage de cinq minutes un culot globulaire de rat normal a une activité héminique de 30 à 50 % de l'activité totale, un culot globulaire de lapin normal de 40 à 70 %, un culot globulaire d'anémie hémolytique humaine de 20 à 40 %. Dans un culot globulaire humain normal, l'activité héminique après un temps si court n'est que de 10-20 % de l'activité fixée, mais celle incorporée dans l'hème après 3 heures atteint seulement 30-40 % contre 70-90 % dans les autres cas (réticulocytes jeunes). Cette observation prouve la rapidité du transport du fer du plasma vers l'hème par une voie directe, qui ne traverse qu'un compartiment de petit volume; une autre fraction du fer est utilisée lentement, en traversant un pool de grand volume. Les observations faites sont donc en faveur du modèle mamillaire (1).

Tableau 14

EVOLUTION DE L'ACTIVITE NON HEMINIQUE TOTALE DE CULOTS GLOBULAIRES INCUBANT APRES MARQUAGE COURT DANS UN PLASMA FRAIS NON MARQUE

(l'activité non héminique est exprimée en pourcentage de l'activité totale)

A - Réticulocytose humaine (maladie de MINKOVSKI-CHAUFFARD)
Incubation 10 minutes. Lavages. Post-incubation en plasma frais autologue. *

Temps de post-incubation	0	7 mn	15 mn	23 mn	34 mn	50 mn	80 mn	124 mn
Pourcentage de l'activité non-héminique	66,5	58	48,5	44	40	38	35,5	32,5
autre sujet	80	63,5	59	56,5	51	48,5	45,5	43,5

* La synthèse d'hème réalisée parallèlement dans les mêmes conditions était linéaire en fonction du temps.

B - Sang humain normal (réticulocytose 1,2 %).
Mêmes conditions expérimentales.

Temps de post-incubation	0	5 mn	17 mn	30 mn	60 mn	95 mn	136 mn
Pourcentage de l'activité non-héminique	71,5	66	60,5	58,5	57,5	56,5	54,5

C - Sang de lapin normal (réticulocytes 3,5 %).
Mêmes conditions expérimentales.

Temps de post-incubation	0	4 mn	10 mn	20 mn	30 mn	60 mn	130 mn
Pourcentage de l'activité non-héminique	44	28,5	21,5	16	13,5	11	8,5

D - Sang de lapin normal. Pré-incubation en sérum physiologique contenant de l'acétate de plomb (molarité finale $0,3.10^{-3}$). Lavage puis conditions expérimentales comme précédemment.

Temps de post-incubation	0	5 mn	10 mn	15 mn	20 mn	40 mn	60 mn	80 mn	100 m
Pourcentage du fer non hémi-nique	75	72,5	72	64,5	62	57,5	57	53	51

E - Sang de lapins rendus saturnins par injection d'acétate de plomb (200 mg/kg - 4 injections - sacrifice au 15ème jour)

Temps de post-incubation	0	5mn	10mn	15mn	20mn	40mn	60mn	80mn	100mn	120m
Pourcentage du fer non-hémi-nique	96,5	93,4	92,9	91,5	90,5	87,2	87,5	87	86,2	86,4

F - Sang de rats normaux. Mêmes conditions expérimentales.

Temps de post-incubation	0	5 mn	16 mn	31 mn	60 mn	89 mn	137 m
Pourcentage du fer non-hémi-nique	57,5	49,5	44	41,5	41	40	39

G - Sang de rats, prélevé 45 minutes après injection in vivo de fer 5
Lavage. Post-incubation en plasma frais.

Temps de post-incubation	0	15 mn	30 mn	45 mn	60 mn	90 mn
Pourcentage du fer non hémi-nique	36	31,5	30	26,5	21,5	20

Le petit volume du compartiment interposé sur la voie directe plasma → hème est prouvé par le début de la courbe de disparition du fer radio-actif non héminique, visible seulement quand l'incubation en plasma marqué a été courte et les lavages rapides. On note dans ce cas une disparition initiale très rapide de cette radio-activité non héminique. La quantité de fer passant par cette voie est estimée à 30-80 % de l'activité totale selon les cas, aussi bien dans les réticulocytes humains que dans ceux de rat. La période de la courbe est très brève, 10 à 20 minutes.

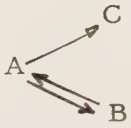
La deuxième partie de la courbe est plus difficile à préciser. Il est en effet possible qu'une partie du fer radio-actif soit bloqué, inutilisable à court terme, dans le stroma; d'autre part, à ces temps tardifs, la synthèse héminique réelle n'est plus rigoureusement régulière avec le temps et s'infléchit. Cependant, à partir des points échelonnés entre 20 et 120 minutes après le début de la post-incubation, on peut mettre en évidence une courbe lente de décroissance de l'activité non héminique représentant 30 à 60 % du fer total incorporé, et dont la période-est de l'ordre de 2 à 4 heures (plus lente chez l'homme, plus rapide chez le rat).

On a aussi étudié la cinétique du fer in vitro dans les réticulocytes de rats, marqués par injection in vivo de radio-fer une demi-heure avant le sacrifice; le culot globulaire était alors lavé et mis à incuber dans un plasma frais. On a dans ce cas observé une disparition de l'activité non héminique selon une simple exponentielle lente (période de 1 h 1/2 à 2 h.) semblable à celle mesurée après marquage in vitro; l'existence d'une courbe initiale rapide est suggérée par le fait que l'extrapolation vers le temps 0 de la courbe observée indique une utilisation par cette voie lente de 50 % seulement du total du fer fixé (tableau 14 G).

L'ensemble de ces observations aboutit par conséquent à admettre un système de deux compartiments métaboliques de taille inégale, organisés selon le système mamillaire, le petit compartiment étant celui interposé entre plasma et hème, le compartiment volumineux étant latéral par rapport à cette voie directe.

3 - Modèle métabolique des mouvements intra-cellulaires du fer.

La courbe de disparition du radio-fer non héminique ne peut donc s'expliquer que par un système de type mamillaire. Il n'existe qu'une seule solution si on identifie A au fer du récepteur de la mambrane :



Si on admet qu'il existe un intermédiaire entre la membrane et le lieu de synthèse de l'hème, ce qui est nécessaire puisque le siège du récepteur (membrane) et le siège de la synthèse (ribosomes) sont différents, on a le choix entre deux schémas différents :

1) Plasma → récepteur → A → C
B

2) Plasma → récepteur → A → C
B

Ces deux schémas ont une signification métabolique différente. Dans le premier le transporteur A est la plaque tournante du métabolisme, comme le plasma l'est à l'échelle de l'organisme entier; la vitesse de synthèse d'hème (C) est fonction de la vitesse respective des mouvements AB et AC. Dans le second cas, le fer fixé est mobilisable à travers deux voies différentes; A et B ont le même rôle de transport et de ralentissement de la synthèse; la vitesse de synthèse d'hème dépend du volume respectif de A et B et du pourcentage de fer traversant les pools A et B.

Du point de vue cinétique, la courbe de disparition du fer radioactif non héminique dans les expériences de "post-incubation" sera la même si A est très petit par rapport à B. Si au contraire A n'est pas négligeable la courbe sera différente dans les deux schémas : dans le second modèle l'activité gagne C à travers deux pools seulement; dans le premier l'activité présente dans B gagne C après dilution dans B, puis dans A, étant

donc deux fois diluée avant d'atteindre l'hème. De même, si on fait incuber la cellule en plasma marqué, on doit observer une courbe d'incorporation héminique du fer différente selon le modèle : dans le second cas, l'activité de A atteint d'abord son maximum et à partir de ce moment le gain d'activité de C à partir de A se traduit par une droite (puisque l'activité spécifique de A et son taux de renouvellement K_A sont constants): l'activité de B atteint son maximum plus lentement; à partir de ce moment la courbe est un système de deux droites. Au contraire, dans le premier schéma, quand B a atteint son activité maximale, le fer qui quitte le pool est retardé par son passage à travers A et l'incorporation du fer venu de B n'est pas linéaire en fonction du temps.

Nous avons cherché par cette méthode à choisir le modèle métabolique et nous avons observé, en faisant incuber des réticulocytes de rat en présence de plasma marqué aulologue, des courbes du type de celle indiquée sur la fig. 3. Cette courbe montre les faits suivants : le retard à l'incorporation du fer dans l'hème n'est observé que pendant les dix premières minutes, la courbe prenant un aspect linéaire au delà de ce temps; au delà de la deuxième heure l'activité fixée et l'activité utilisée pour l'hème par unité de temps diminuent; entre la 15ème et la 120ème minute, l'activité fixée dans l'hème progresse plus vite que l'activité cellulaire totale. On peut déduire de ces trois observations les conclusions suivantes:

a) Le compartiment A atteint très rapidement son activité spécifique maxima, dès la 10ème minute de l'incubation.

b) Au delà de la 2ème heure, l'expérience n'est plus interprétable, parce que la fixation de fer et la synthèse d'hème ne sont plus linéaires en fonction du temps.

c) L'augmentation d'activité de l'hème plus importante que l'augmentation du taux de fer fixé, entre 10 et 120 minutes, prouve la mise à la disposition de la synthèse du fer qui a traversé le pool de grand volume. L'activité spécifique maxima est atteinte vers la 100ème minute.

Les expériences nous permettent donc de confirmer l'existence de deux pools métaboliques différents dans leur vitesse de renouvellement. Mais elles ne permettent pas de choisir entre les deux hypothèses formulées plus haut : en effet la tail-

le de A est très petite et le retard supplémentaire subi par le fer de B à cause de son passage à travers A (schéma 1) ne se traduirait que par un minime décalage de la courbe linéaire donnée par le schéma métabolique 2; la différence des deux courbes théoriques est trop faible pour qu'on puisse valablement confronter la courbe expéritemtale imparfaite à ces courbes théoriques. D'autre part, au delà de la 120ème minute, le taux de synthèse réelle d'hème diminue et l'interprétation de la courbe d'incorporation héminique du fer est impossible.

4 - Volume des compartiments intra-cellulaires non héminiques.

Les expériences présentées ci-dessus indiquent l'existence de deux compartiments métaboliques, non héminiques, à taux de renouvellement différent. Leur volume respectif pourrait être calculé directement si on pouvait les isoler l'un de l'autre, soit par leur caractère biochimique, soit par leur localisation : ceci n'est pas le cas. Aussi ne peut-on aborder le problème que par la mesure du taux de disparition de l'activité non héminique, en admettant la synthèse d'hème constante pendant la durée de l'expérience.

La formule rendant compte du flux de fer vers l'hème est différente selon les deux schémas métaboliques (1) et (2) présentés plus haut. On appellera K_{AC}, K_{AB}, K_{BA} le pourcentage par unité de temps des pools A et B renouvelés à destination respectivement de C, B et A; dans le cas du schéma (2) on appellera a la proportion du fer extérieur qui gagne C à travers A, et on appellera b = (1 - a) celle qui gagne C à travers B; dans le cas du schéma (1) la valeur a/b est égale à la valeur K_{AC}/K_{AB}. La valeur F du flux de fer vers l'hème est simple à calculer dans le cas du schéma (2) :

$$(II) \quad F = a K_{AC} A + (1 - a) K_{BC} B$$

Dans le cas du schéma (1), ce flux comprend le mouvement direct à travers A, et le mouvement qui traverse B : mais en outre une partie du fer qui gagne A à partir de B regagne de nouveau B en fonction du rapport K AC/K AB.

$$(I) \quad F = A (K_{AC} - K_{AB}) + B (K_{BA})$$

L'étude des courbes de disparition du fer non héminique ne permet pas de calculer trois paramètres de renouvellement, faute actuellement d'avoir accès à un seul des deux comparti-

ments A ou B. Mais si, comme le suggère l'étude expérimentale, A est très petit et a un renouvellement très rapide, la différence est très faible entre les deux modèles et on peut avec une faible erreur utiliser l'équation (II).

Dans cette équation, le flux F en mg de fer par unité de temps est obtenu par la mesure de la synthèse réelle d'hème à partir de glycine -2-C 14. Les taux de renouvellement K_{AC} et K_{BC} sont déduits de la période des deux courbes exponentielles de disparition de l'activité non héminique après lavage et mise en incubation en plasma frais. Les valeurs a et (1 - a) sont les taux de fer passant à travers A et à travers B, déduits par extrapolation de chacune des exponentielles expérimentales à l'axe du temps. En mesurant le flux de fer vers l'hème une heure après le lavage (tout mouvement direct à travers A est supprimé), ce flux indique seulement l'utilisation de radio-fer à partir de B, et permet le calcul de B. Connaissant cette valeur, on peut en déduire A.

On a trouvé ainsi des valeurs pour B de 100 à 400.10^{-5} gammas/10^7 réticulocytes, et pour A de 2 à 10.10^{-5} gammas/10^7 réticulocytes. Les mesures sont à rapporcher du chiffre d'environ 1000.10^{-5} gammas de fer non héminique pour 10^7 réticulocytes, donné par les mesures chimiques du fer total non héminique (143). Bien entendu ces valeurs sont très approximatives : le modèle utilisé n'est qu'une approximation; les courbes expérimentales sont aléatoires parce que le taux de synthèse d'hème n'est pas in vitro rigoureusement proportionnel au temps même pendant les deux premières heures. Enfin il est possible qu'existe un mouvement de B vers des réserves plus "fixées" que celles testées par l'incubation de 3 heures in vitro, ce qui reviendrait à considérer que B ne serait pas un compartiment homogène au point de vue cinétique. Ce point fait l'objet du paragraphe suivant :

5 - Non utilisation d'une partie du fer fixé

Les schémas métaboliques présentés impliquent, si on marque une cellule et qu'on la fasse incuber en plasma frais, que l'incorporation du fer dans l'hème tend vers 100 % de l'activité fixée. Il n'y a en effet aucun mouvement du fer, à partir de l'hème, vers les compartiments non héminiques.

De fait, in vivo, l'activité circulante est sous forme héminique à près de 100 % dès la 24ème heure chez le rat, dès la 48ème heure chez l'homme. Mais selon certains (30), une par-

tie du fer fixé a pu n'être pas utilisée et a pu être excrété par la cellule après sa mise en circulation; en effet le sang du sujet splénectomisé contient des sidérocytes absents chez le sujet normal; les sidérocytes marqués par 51 Cr et injectés à un sujet normal perdent leurs grains de fer sans disparaître de la circulation.

In vitro l'incorporation héminique du fer n'atteint pas 100 % de l'activité fixée. Ceci n'est pas dû seulement aux conditions expérimentales qui limitent la durée de l'expérience; en effet l'extrapolation à un temps "infini" de la courbe d'incorporation globulaire du fer aboutit pour des réticulocytes jeunes et des érythroblastes d'homme, de lapin et de rat à des chiffres de 70 à 90 %. Dans les cellules plus âgées le pourcentage utilisable de l'activité fixée est nettement plus faible, n'atteignant pour des réticulocytes humains circulants normaux (c'est-à-dire mûrs) que 20 à 40 % du fer fixé. Dans ce deuxième cas cependant, la fixation totale de fer est faible; l'importance relative d'une fixation par les cellules mûres incapables de mobiliser et d'utiliser le fer fixé est plus grande que dans un culot de cellules jeunes. Ces observations indiquent que dans toutes les cellules une partie du fer fixé échappe à l'utilisation rapide (en quelques heures) étudiée dans les chapitres précédents.

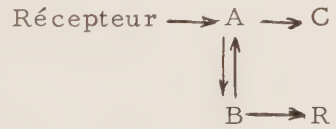
Cette mise en réserve est prouvée par un autre fait. On a supposé jusqu'ici que la différence du taux de synthèse vraie calculé à partir de la glycine -2-C 14 avec le taux de synthèse apparent à partir du radio-fer plasmatique n'est due qu'à une dilution de ce radio-fer dans des compartiments métaboliques ; le pourcentage de l'incorporation héminique du fer fixé et le rapport des synthèses apparente (c'est-à-dire mesurée à partir du fer plasmatique) et réelle (c'est-à-dire mesurée à partir de la glycine) devraient alors être semblables. On a constaté, à la 3ème heure d'incubation, les valeurs suivantes du pourcentage d'incorporation héminique du fer fixé pour des réticulocytes humains mûrs et jeunes, des réticulocytes de rat et de lapin : 22 %, 57 %, 74 %, 84 %; pour les mêmes cellules, étudiées dans les mêmes conditions, le rapport de la synthèse apparente à la synthèse réelle était respectivement de 0,12 0,37, 0,65, 0,75. Il est donc nécessaire que des cellules aient synthétisé de l'hème à partir d'un autre pool de fer que celui marqué, ou bien qu'une partie du fer fixé ait été dévié vers une réserve non utilisée pendant les 3 heures de l'épreuve.

Cette hypothèse d'une mise en réserve d'une fraction du fer fixé est encore appuyée par les constatations faites dans des

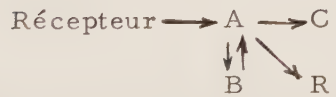
expériences de post-incubation en plasma froid après marquage; le fractionnement des cellules en surnageant et stroma a montré que l'activité non héminique du stroma baissait dans les premières 100 minutes, puis atteignait une valeur fixe jusqu'à la 3ème heure.

On doit donc admettre qu'une partie du fer fixé, d'environ 20 - 30 % pour des cellules très jeunes, n'est pas immédiatement métabolisée vers les compartiments intermédiaires et l'hème. Elle constitue une réserve, apparemment non échangeable in vitro avec le plasma, et non utilisée in vitro pendant les 3 heures de l'incubation. In vivo ce fer de réserve non héminique disparaît, soit parce que la cellule en vieillissant a besoin d'une telle réserve et s'en sert pour la synthèse d'hème, soit parce que ce fer est excrété par un mécanisme du type de celui décrit par CROSBY (30).

La mise "à l'écart" (du moins dans les conditions de temps de l'expérimentation in vitro) d'une fraction du fer fixé doit être prise en considération pour dresser les courbes de renouvellement des compartiments non héminiques intra-cellulaires. Elle doit aussi être prise en considération pour interpréter les chiffres de radioactivité non héminique mesurés dans les expériences de post-incubation avec fractionnement cellulaire dont les résultats sont donnés ci-dessous. Cette mise à l'écart modifie le schéma métabolique, et aboutit à une conception telle qu'indiquée ci-dessous.

1) 

ou

2) 

6 - Localisation des compartiments métaboliques du fer

La plupart des expériences ont été menées sur du sang de lapin rendu très réticulocytaire (réticulocytose supérieure à 20 %) par injection une semaine auparavant d'acétylphényl hydrazine; après marquage, les cellules étaient lavées et remises en suspension en plasma froid; les cellules, prélevées à inter-

valles réguliers,étaient lysées et subissaient un fractionnement comme indiqué plus haut.

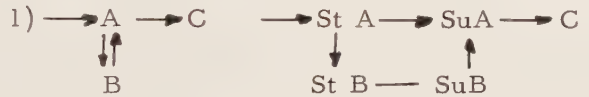
La radioactivité non héminique des ribosomes et des mitochondries était toujours très faible. Dans toutes les expériences, que la durée d'incubation en plasma marqué ait été courte (10 minutes) ou longue (1 heure), on trouvait dans les échantillons successifs prélevés dans le cours de la post-incubation une activité non héminique de ces organes constante par rapport à l'activité non héminique totale des cellules. L'activité non héminique liée aux ribosomes représentait 0,5 à 1 % de l'activité non héminique totale; l'activité liée aux mitochondries représentait 2 à 4 % de l'activité non héminique totale. On ne peut tirer de ces faits aucun argument pour discuter le siège de la synthèse héminique; le taux d'activité très faible des mitochondries et ribosomes peut être du à un turnover très rapide du fer au niveau de ces structures; on s'accorde en effet à voir dans les ribosomes le siège de synthèse de l'hémoglobine; et l'hème-synthétase est un enzyme corpusculaire (52).

Lorsque l'incubation préalable en plasma marqué était courte (10 mn), on notait que l'activité non héminique du stroma représentait initialement environ un tiers du fer non héminique total, les deux autres tiers étant dans le surnageant. La courbe de disparition est double, d'abord très rapide, apparemment exponentielle avec une période de l'ordre de 10-20 minutes, puis plus lente, exponentielle d'une période de l'ordre de une heure chez le lapin. Une courbe semblable a été observée dans le stroma des réticulocytes humains (anémie hémolytique congénitale sphérocytaire), la seconde composante de la courbe paraissant plus lente que chez le lapin.

Le fer non héminique du surnageant paraît fourni, au moins en partie, par le stroma. Les arguments en ce sens sont les suivants. Il reste peu de fer non héminique dans le stroma alors qu'il en persiste dans le surnageant, au cours des expériences où l'incubation préalable a été longue (1 et 2 heures). Dans les temps initiaux, au moment où l'activité en fer non héminique du stroma baisse très vite, l'activité non héminique du surnageant baisse plus lentement. Si on admet que le fer libéré du stroma passe dans le surnageant avant de gagner l'hème, on doit mesurer la perte réelle d'activité du surnageant comme étant la somme de la perte propre observée dans les échantillons successifs de ce matériel, et de la perte observée dans le même temps dans le stroma (qui se traduit par un gain d'activité pour le surnageant). Dans ces conditions on observe ici encore que la

courbe se décompose en deux parties, l'une initiale rapide, l'autre tardive plus lente (le fer non héminique du surnageant se renouvelant alors à un taux d'environ 20 % par heure).

Ces constatations paraissent indiquer que stroma et surnageant participent l'un et l'autre à la constitution des deux pools métaboliques, de petit et de grand volume. Elles sont compatibles avec les schémas suivants, qui ne sont que l'extension des schémas métaboliques présentés dans le 3ème paragraphe de ce chapitre. Par contre elles éliminent l'hypothèse selon laquelle le stroma serait le support d'un des pools métaboliques, et le surnageant le support de l'autre, comme on aurait pu le supposer. On a appelé St A et St B les fractions des pools A et B présentes dans le stroma, et Su A et Su B les fractions de ces mêmes pools présentes dans le surnageant.



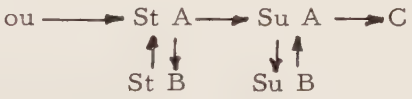


schéma métabolique général

schéma général appliqué aux structures intra-cellulaires

IV - INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT CELLULAIRE SUR LA CINETIQUE DU FER

Les expériences quantitatives exigent que les résultats soient exprimés en poids de métal utilisé par cellule. Or les cellules mûres circulantes ne peuvent pas réaliser de synthèse héminique alors que les réticulocytes, qui conservent mitochondries et ribosomes, en sont capables. Tous les travaux mesurant la synthèse d'hème ou de globine in vitro expriment les résultats en poids de substance utilisée, ou synthétisée, par cellule immature, c'est-à-dire par réticulocyte (seule cellule immature

du sang). Le mode d'expression, que nous avons utilisé, n'est pas complètement satisfaisant pour plusieurs raisons :

a) La population réticulocytaire est hétérogène. Chez un sujet normal, la cellule anucléée mûrit un ou deux jours dans la moelle avant d'être mise en circulation; le réticulocyte de l'homme normal est donc déjà âgé. Dans les anémies régénératives, l'hyper-réticulocytose est non seulement un stigmate de surproduction, mais aussi une conséquence d'une excrétion hors de la moelle plus précoce que normalement. Dans les anémies par dysérythropoïèse - thalassémie, anémie de Biermer - il existe une diminution de la durée de séjour médullaire des réticulocytes. Chez le lapin, le réticulocyte séjourne peu de temps dans la moelle et, de ce fait, la réticulocytose (en moyenne 4 %) est élevée compte tenu de la production réelle et de la durée de vie cellulaire moyenne (50 jours environ).

Ainsi, la population réticulocytaire, d'un sujet ou d'une espèce à l'autre, n'est pas la même,comportant un nombre important ou faible de cellules encore jeunes dont il n'est pas a priori prouvé qu'elles utilisent le fer comme les réticulocytes proches de la maturité.

b) La notion même de réticulocyte est fondée sur son affinité tinctoriale pour les colorants, dits "vitaux", qui colorent le système des ribosomes. Il n'est pas prouvé que la perte de capacité de synthèse héminique est rigoureusement contemporaine de la disparition de cette affinité tinctoriale.

Ces difficultés nous ont amené à étudier l'influence du vieillissement cellulaire sur la cinétique du fer in vitro.

1) - Fixation cellulaire du fer et vieillissement cellulaire

Nous avons cherché si la fixation cellulaire du fer était fonction de la jeunesse cellulaire en étudiant in vitro cette fixation sur des réticulocytes de sujets normaux ou de sujets présentant une réticulocytose plus ou moins élevée (donc une population réticulocytaire plus ou moins jeune); nous avons aussi étudié la fixation sur des réticulocytes ayant vieilli in vitro et in vivo. Dans toutes ces expériences le fer était apporté lié à un plasma normal et non par le plasma autologue; l'influence de la qualité du plasma sur la fixation du fer pouvait donc être éliminée dans ces expériences.

a) La corrélation entre le taux de réticulocytes et le taux de fixation du fer est très bonne chez les sujets normaux et dans les réticulocytoses peu élevées (inférieures à 10 %).

Dans les aplasies où la réticulocytose est basse, la fixation du fer par réticulocyte est paradoxalement trop élevée; ceci suggère que la fixation globulaire du fer se fait éventuellement sur des cellules plus mûres que le réticulocyte, même non capables de synthèse de l'hème.

Dans les hyposidérémies, la fixation du fer par cellule est toujours très élevée à partir du plasma normal; ceci traduit l'avidité cellulaire pour le fer, due à la vacuité du récepteur cellulaire.

Dans les troubles de maturation érythrocytaire, chaque réticulocyte fixe beaucoup plus de fer qu'un réticulocyte normal, notamment dans les thalassémies; ceci peut être en rapport, non seulement avec une "jeunesse" particulière des cellules, mais aussi avec un trouble particulier du métabolisme du fer; cette possibilité a été étudiée et les résultats seront détaillés dans le chapitre V.

Dans les plus grandes hyperhémolyses, le réticulocyte paraît fixer un peu plus de fer que le réticulocyte normal.

Le tableau 15 donne des exemples des faits obtenus; on a exprimé la réticulocytose et le taux de fixation du fer par rapport au témoin normal testé le même jour; l'absence d'une bonne corrélation entre la fixation du fer et la réticulocytose est prouvée par l'absence d'identité des chiffres des colonnes I et II.

b) On a réalisé un vieillissement réticulocytaire in vitro en laissant incuber des cellules, en plasma ou en solution de Ringer glucosée, sans air, avec agitation automatique selon une méthode proposée par MAZUR et coll. (95). L'incorporation globulaire était mesurée à partir d'un plasma frais et exprimée en poids de fer fixé pour 10^7 réticulocytes persistant - la diminution de leur nombre étant due à la fois à une hémolyse in vitro et au phénomène de vieillissement.

On a constaté que la fixation du fer, pour le même nombre de réticulocytes, ne diminuait pas nettement (tableau 16 B). Ce résultat s'accorde avec celui d'une expérience du même type de Clark et Walsh qui, après incubation in vitro, notent une baisse plus nette de l'utilisation du fer que de sa fixation cellulaire (28).

Tableau 15

CORRELATION ENTRE LA RETICULOCYTOSE ET LA FIXATION CELLULAIRE IN VITRO DU FER. AUX TAUX TRES BAS ET AUX TAUX ELEVES DE RETICULOCYTOSE CHEZ L'HOMME

Diagnostic	Réticulocytose (par rapport au témoin normal)	Fixation globulaire du fer (par rapport au sujet normal)	Taux d'utilisation du fer (Pourcentage du fer fixé)
Aplasie toxique	0,2	0,7	7,3 %
Aplasie primitive	0,2	1,1	5 %
Anémie réfractaire	1,5	23,7	58 %
id.	1,8	9	29 %
id.	5	8,5	35 %
Anémie mégaloblastique	5	42	58 %
id.	2,8	2,8	48 %
Thalassémie majeure	3	39,5	28 %
id.	3	18,5	34 %
id.	3	69	38 %
id.	8	55	33 %
id.	9	35	19 %
id.	1,5	10,2	34 %
Anémie hémolytique	6	5,1	22 %
id.	8,6	9	27 %
id.	11	73	43 %
id.	25	25	34 %
id.	40	41	96 %
id.	41	87	69 %

Tableau 16

FIXATION GLOBULAIRE DU FER EN UNE HEURE
A PARTIR DE PLASMA MARQUE

A - Sur des réticulocytes ayant vieilli in vivo (réticulocytes de rat)

	prélèvement 4 h après la transfusion	prélèvement 12h après la transfusion	prélèvement 30h après la transfusion	prélèvement 48h après la transfusion
Première expérience				
Réticulocytose	5,6 %	4,6 %	3,2 %	2,2 %
Fixation du fer ($10^{-5}\gamma$ /10^7 réticul.)	6,8	5,8	5,4	4,4
Seconde expérience				
Réticulocytose	12 %	8,3 %	4,1 %	2,1 %
Fixation du fer ($10^{-5}\gamma$ /10^7 réticul.)	4,8	4,5	3,8	3,5

B - Sur des réticulocytes ayant vieilli in vitro (anémie hémolytique humaine)

Moyenne de expériences	culot frais	après 3 h de conservation	après 24 h de conservation	après 48 h de conservation
Fixation du fer ($10^{-5}\gamma$ /10^7 réticul)	7,0	6,8	6,7	5,9

c) Dans trois expériences, on a étudié la cinétique du fer après vieillissement réticulocytaire in vivo. On a injecté au rat, par voie intra-péritonéale, un volume de 8 ml de sang de rats rendus hyper-réticulocytaires par hémolyse préalable à la phénylhydrazine ou par saignée. L'hypervolémie globulaire ainsi créée bloque l'érythropoïèse normale du receveur et pratiquement, pendant les 3-5 jours suivants, la réticulocytose est seu-

lement celle liée aux réticulocytes injectés et à ceux présents préalablement à la transfusion chez le receveur : les réticulocytes vieillissent ainsi réellement in vivo.

On note dans ces expériences une baisse modérée de la fixation globulaire du fer (Tableau 16 A).

Il existe donc seulement une baisse modérée de la fixation globulaire du fer contemporaine du vieillissement cellulaire. Par contre, sur les cellules mûres, ayant perdu le système ribosomique, la fixation est nulle ou négligeable.

2) Synthèse héminique au cours du vieillissement cellulaire

Les mêmes expériences ont été faites en utilisant simultanément la glycine marquée par le C 14 et le fer radioactif.

a) Il existe chez l'homme, chez le lapin et chez le rat une corrélation étroite entre les taux de synthèse réelle d'hème à partir de la glycine et la réticulocytose, quelque soit le taux de cette dernière (Tableaux 11 et 18).

b) Au cours du vieillissement in vitro, les capacités de la cellule de synthétiser l'hème à partir de la glycine s'abaissent légèrement, mais moins que la capacité d'utiliser le fer. Ceci est indiqué dans le tableau 17 B.

c) Au cours du vieillissement in vivo dans les conditions décrites plus haut, l'utilisation héminique de la glycine, pour un taux égal de réticulocytes, reste constante alors que celle du fer plasmatique diminue (tableau 17 C).

Les faits indiquent que le réticulocyte conserve pendant toute sa vie approximativement la même possibilité de synthétiser l'hème. En outre, on a pu montrer, en comparant la synthèse réelle d'hème (à partir de glycine C 14) entre réticulocytes et érythroblastes de rat, que la synthèse "horaire" par ces deux types de cellules était sensiblement du même ordre.

3) Utilisation globulaire du fer au cours du vieillissement

L'anomalie la plus nette, contemporaine du vieillissement du réticulocyte, est un trouble de l'utilisation globulaire du fer.

Tableau 17

CONSEQUENCE DU VIEILLISSEMENT SUR LA SYNTHESE HEMOGLOBINISUE ET LA CINETIQUE DU FER

A) Culot cellulaire d'anémie hémolytique humaine, après vieillissement "in vitro" pendant 3 heures, 24 heures et 36 heures. L'incubation en présence de plasma marqué était chaque fois de 3 heures.

	après 3 h de vieillissement	après 24h de vieillissement	après 36h de vieillissement
Réticulocytose	36.10^7	24.10^7	17.10^7
Fixation cellulaire du fer	71.10^{-3} γ	64.10^{-3} γ	28.10^{-3} γ
Fixation cellulaire du fer par 10^7 réticulocytes	200.10^{-5} γ	260.10^{-5} γ	164.10^{-5} γ
Pourcentage d'utilisation héminique du fer fixé	13,2 %	0,6 %	0,5 %
Synthèse d'hémoglobine à partir du fer plasmatique (pour 10^7 réticulocytes)	77.10^{-3} γ	$4,4.10^{-3}$ γ	$2,5.10^{-3}$ γ
Synthèse d'hémoglobine à partir de la glycine (pour 10^7 réticulocytes)	194.10^{-3} γ	49.10^{-3} γ	32.10^{-3} γ
Rapport des deux chiffres précédents	1/2,5	1/11	1/13

B) Culot cellulaire de sang normal humain, incubant en plasma marqué et testé à intervalles réguliers

	0 - 1 h	1 h - 2 h	4 h - 5 h	7 h - 8 h
Synthèse totale d'hémoglobine à partir du fer plasmatique (pour 1 ml de culot globulaire)	20.10^{-3} γ	$10.8.10^{-3}$ γ	$5.7.10^{-3}$ γ	4.10^{-3} γ
Synthèse totale d'hémoglobine à partir de la glycine -2-C 14 (pour 1 ml de culot globulaire)	330.10^{-3} γ	270.10^{-3} γ	245.10^{-3} γ	215.10^{-3} γ
Rapport des deux chiffres précédents	1/17	1/25	1/43	1/54

C) Culot globulaire de sang de rat transfusé par du sang d'animal saigné (vieillissement in vivo)

	Culot globulaire étudié 4 h. après transfusion	Culot globulaire étudié 12 h après transfusion	Culot globulaire étudié 30 h après transfusion	Culot globulaire étudié 48 h après transfusion
Synthèse hémoglobinique observée à partir du fer (pour 10^7 réticulocytes)	21.10^{-3} γ	10.10^{-3} γ	$7.5.10^{-3}$ γ	$4.4.10^{-3}$ γ
Synthèse hémoglobinique observée à partir de la glycine (pour 10^7 réticulocytes)	$29.5.10^{-3}$ γ	$29.5.10^{-3}$ γ	$22.5.10^{-3}$ γ	23.10^{-3} γ
Rapport des deux chiffres précédents	1/1,4	1/2,95	1/3	1/5,2

a) La comparaison du taux d'utilisation du fer par des réticulocytes humains d'anémie hémolytique et des réticulocytes humains normaux montre une différence frappante du pourcentage d'utilisation. Ce fait est aussi observé chez le lapin (tableau 18).

On peut prouver que le taux de l'utilisation du fer par la cellule âgée n'est pas dû à un ralentissement du transit du fer radioactif venu du plasma à travers un compartiment de plus grand volume dans cette cellule que dans la cellule plus jeune. En effet, dans ce cas, la poursuite de l'incubation montrerait une élévation progressive du pourcentage du fer fixé utilisé, ce qui n'est pas le cas, alors même que la synthèse d'hème se poursuit comme le montre l'utilisation de la glycine -2-C 14.

b) Au cours du vieillissement in vitro, le pourcentage de fer utilisé s'effondre beaucoup plus vite que la fixation globulaire de ce fer (tableau 17 A).

c) Les expériences de vieillissement globulaire in vivo montrent aussi une baisse d'utilisation héminique du fer alors que la synthèse vraie n'est pas modifiée (tableau 17 C).

d) Les expériences de post-incubation de cellules marquées d'un culot globulaire normal (réticulocytes "âgés") montrent que le fer radioactif inutilement fixé est principalement dans le stroma. Après une mobilisation rapide vers le surnageant d'une partie de l'activité fixée au stroma, l'activité non héminique du stroma reste stable alors que celle du surnageant s'abaisse. Ceci indique que le blocage lié au caractère "vieilli" de cette cellule est un blocage sur la voie du fer non héminique, entre le stroma et le surnageant.

°
° °

Ces observations confirment l'absence d'un parallèlisme rigoureux entre la synthèse d'hème et la fixation et l'utilisation du fer plasmatique. La synthèse d'hème, testée par l'incorporation de glycine, se poursuit jusqu'à un stade avancé de la vie du réticulocyte, la disparition de cette synthèse dépend probablement, comme toutes les synthèses protéiques, de la dégradation du système des polyribosomes (171). La diminution du pourcentage d'utilisation du fer extérieur fixé à la cellule est un phéno-

mène plus précoce au cours du vieillissement du réticulocyte; il est suivi lui-même d'une baisse du taux pondéral de la fixation, probablement à cause de la saturation en fer du récepteur de la membrane, conséquence de la non-mobilisation du fer à partir de ce récepteur.

On doit donc admettre l'existence d'un compartiment de fer non héminique présent dans les cellules et utilisable pour la synthèse dans des cellules vieillies où le fer extérieur ne peut plus alimenter ce compartiment. Et on peut admettre aussi que la première conséquence du vieillissement est une diminution du taux de transfert du métal entre le récepteur du stroma et le pool non-héminique dont la machinerie enzymatique intracellulaire se sert pour synthétiser l'hème.

Tableau 18

L'UTILISATION HEMINIQUE DU FER PLASMATIQUE EST AUGMENTEE DANS LES CAS D'HYPERRETICULOCYTOSE LA SYNTHESE REELLE D'HEME (GLYCINE C 14) N'EST PAS MODIFIEE

	Nombre d'explorations	Pourcentage d'utilisation héminique du fer	Synthèse d'hémoglobine calculée en $10^{-3}\gamma/10^7$ réticulocytes	
			à partir du fer plasmatique	à partir d la glycine
Hommes normaux testés le même jour que les sujets pathologiques (réticulocytose moyenne: 0,8 %)	16	9,5 (4 à 18)	2,35	102
Hommes présentant une hyper réticulocytose (supérieure à 4 %)	16	46 (21 à 86)	53,5	100
Lapins normaux (réticulocytose 2 - 4 %)	6	49 (31 à 64)	145	325
Lapins ayant reçu de la phényl-hydrazine (réticulocytose 9 - 24 %)	6	65 (34 à 90)	270	355

V - ANOMALIES DE LA CINETIQUE INTRA-CELLULAIRE DU FER DANS LES CONDITIONS PATHOLOGIQUES.

Les précédents chapitres ont montré qu'un bilan quantitatif de la fixation et de l'utilisation du fer in vitro est possible. Ils ont montré que la cellule utilise le fer extérieur, d'une part directement à travers un compartiment métabolique de petite taille très rapidement renouvelé, d'autre part à travers un compartiment de grande taille à renouvellement lent; ce compartiment fonctionne comme une réserve pour les cellules inaptes à utiliser le fer extérieur bien qu'encore aptes à une synthèse d'hème (réticulocytes vieillis).

Il n'existe dans les cellules rouges immatures que très peu de fer non héminique. Il y a donc un équilibre entre la fixation et l'utilisation du fer. Dans les cas pathologiques, le fer non-héminique peut disparaître complètement (hyposidérémies) ou au contraire s'accumuler très anormalement (thalassémies, saturnisme, anémies normochromes sidéroblastiques réfractaires). On a donc cherché s'il existait dans les cas pathologiques des anomalies quantitatives du mouvement du fer, insuffisance ou excès de la fixation du fer, de la mise en réserve, de l'utilisation pour la synthèse.

1) Calcul du bilan métabolique du fer

L'utilisation simultanée de fer radioactif et de glycine à partir de plasma par des culots globulaires permet d'établir un bilan de l'utilisation du fer in vitro. On a ainsi défini les six valeurs suivantes :

1) Quantité de fer fixé par les réticulocytes en 3 heures d'incubation;
2) Quantité du fer fixé utilisé pour l'hème (à partir du chiffre précédent et du pourcentage d'utilisation héminique du fer);
3) Quantité du fer ayant gagné le compartiment de grand volume (B) : différence entre les valeurs 1 et 2.
4) Quantité réelle de fer utilisé à la synthèse d'hème : calculée à partir de la détermination de la synthèse réelle d'hème connue par l'utilisation de glycine 2 - C 14; (fer utilisé -mg- = quantité d'hémoglobine synthétisée - mg - x 1000/3,4).

5) Quantité de fer du compartiment de grand volume (B) utilisée pour l'hème : différence entre les valeurs 4 et 2.

6) Déficit ou gain en fer de la cellule; différence entre les valeurs 3 et 5.

Les états pathologiques choisis étaient typiques : des anémies hypochromes hyposidérémiques où l'on sait que le taux de toutes les réserves de fer est effondré et où notamment le fer non héminique des cellules rouges a disparu (comme le montrent les méthodes chimiques et cytologiques); des aplasies, où la réticulocytose est nulle ou très faible, les seules cellules présentes étant supposées vieilles; des thalassémies et des saturnismes où il existe une surcharge majeure en fer non héminique des cellules rouges immatures.

2) Etude des mouvements du fer in vitro dans les réticulocytes d'anémie hypochrome hyposidérémique

Dix huit anémies hypochromes hyposidérémiques (fer sérique : moins de 40 γ/100 ml) ont été étudiées; 14 n'avaient reçu aucun traitement. Les résultats sont indiqués dans le tableau 19, par comparaison avec ceux obtenus à partir d'autant d'expériences faites, le même jour et dans les mêmes conditions, sur un culot globulaire de sujet normal.

Les faits observés indiquent que le réticulocyte d'anémie hypochrome ne synthétise pas sensiblement plus d'hème que le réticulocyte normal. Dans les trois cas étudiés par VAVRA, le taux de synthèse d'hème à partir de glycine 2 - C 14 est également normal ou inférieur aux valeurs normales (149). Par contre, presque tout le fer utilisé vient du plasma, ce qui indique une vacuité quasi complète du compartiment intermédiaire non héminique. D'autre part, compte tenu de la réticulocytose modérée, la fixation de fer plasmatique est considérable, lorsque le réticulocyte d'anémie hypochrome incube dans un plasma normal (saturation de la sidérophiline : 40 %). Ceci confirme les observations du chap. 2 selon lesquelles à saturation égale de la transferrine, on note que le degré de désaturation du compartiment récepteur de la membrane règle la fixation globulaire du fer.

Dans les quatre cas déjà traités mais encore hypochromes, on a observé les faits suivants : réticulocytose moyenne 1,5 %,

Tableau 19

FAITS OBSERVES DANS L'ANEMIE HYPOCHROME HYPOSIDEREMIQUE NON TRAITEE "IN VITRO"

	Fixation globulaire du fer	Pourcentage d'utilisation héminique du fer fixé	Taux de synthèse à partir du fer du plasma	Taux de synthèse d'hème à partir de la glycine	Réticulocytose (pourcentage)
Sujets normaux (14 cas)	11.10^{-5} γ /10^7 réticul.	11 %	$3.55.10^{-3}$ γ /10^7 réticul.	160.10^{-3} γ /10^7 réticul.	1 %
Anémies hypochromes hyposidérémiques (14 cas)	131.10^{-5} γ /10^7 réticul.	32,5 %	127.10^{-3} γ /10^7 réticul.	172.10^{-3} γ /10^7 réticul.	2,6 %

synthèse héminique du fer égale à celle du témoin, fixation cellulaire du fer se rapprochant de celle d'un culot normal ($17.10^{-5}\gamma/10^7$ réticulocytes), alors que le pourcentage de fer utilisé reste élevé (50 %, contre 8,5 % dans les quatre culots témoins correspondants). Ces faits sont très nets dans deux autres anémies hypochromes où on a pu suivre l'utilisation du fer in vitro au fur et à mesure du traitement, chaque 5 jours. Dans ces deux cas, l'évolution des anomalies de la cinétique du fer est la même. Dans la phase initiale, la cellule continue à fixer et à utiliser avec grande rapidité le fer extérieur, mais en dirige aussi une grande quantité vers la mise en réserve. Dans un second temps (après 5 à 10 jours de traitement), les réserves étant reconstituées, le taux de fixation de fer par cellule diminue franchement, mais la quantité fixée est utilisée pour l'hème à un haut pourcentage; la cellule circulante préfère à ce stade l'emploi du fer extérieur à l'emploi de celui de sa réserve. Enfin après 10 à 15 jours, les réticulocytes étudiés se comportent comme les réticulocytes normaux, avec fixation cellulaire faible et large utilisation pour la synthèse héminique du fer des réserves reconstituées.

Divers renseignements peuvent être tirés de l'étude des anémies hypochromes.

Le premier fait est le rôle de la désaturation des compartiments non héminiques, expliquant le très haut taux de la fixation du fer, par cellule immature, lorsque cette cellule incube en présence d'un plasma normal, où la transferrine est saturée à 30-40 % environ. Cela est une confirmation de l'observation discutée plus haut (chap. 2) que le taux de fixation du fer dépend de la saturation respective du transporteur (sidérophiline) et du récepteur.

Le second fait est l'importance pour la cellule rouge de la reconstitution de ses réserves globulaires, puisque dès le 10ème - 15ème jour du traitement, la cinétique du fer est déjà ser semblable à celle observée dans le réticulocyte normal; or, à cette période, les autres réserves en fer de l'organisme sont encore vides.

Le troisième fait à noter est l'importance du fer dans la régulation d'une érythropoïèse qualitativement et quantitativement apparemment normale. D'une part, on note constamment dans ces cas que dès le début du traitement martial la réticulocytose

s'élève, indice de surproduction cellulaire dans la moelle; ce fait est connu, mais le mode d'action du fer est mal expliqué; il est légitime de supposer que dans les hyposidérémies, une part non négligeable des cellules trop hypochromes meurt dans la moelle (117) et que l'action du fer est de permettre une charge en hémoglobine suffisante pour que les cellules reçoivent leur "visa de sortie" et apparaissent comme réticulocytes à la périphérie. D'autre part, malgré son hypochromie, le réticulocyte in vitro ne synthétise pas plus d'hème que celui normal, même alors que du fer en abondance lui est fourni par un plasma normal, ce qui suggère la nécessité de fer en quantité suffisante dans la cellule pour accélérer la synthèse; diverses expériences ont d'ailleurs montré que la présence de fer bivalent potentialise la synthèse de globine (71) et surtout accélère la transformation de glycine en ALA (150) bien que dans des organismes microbiens l'activité de l'ALA-synthétase soit inhibée et non pas excitée par le fer libre (26). L'ALA - déhydrase serait normale dans les anémies sidéropéniques (166).

L'expérience suivante confirme que la fourniture de fer est nécessaire au fonctionnement de la réaction de synthèse d'ALA, réaction qui règle quantitativement la synthèse de l'hème. Un culot globulaire d'un sujet ayant une forte anémie hypochrome a incubé en présence de fer, d'ALA et de glycine amenés dans du plasma, et en présence d'ALA et de glycine amenés en sérum physiologique. On a constaté qu'en présence de plasma (qui apporte du fer à la cellule), l'utilisation de la glycine pour la synthèse d'hème était plus élevée que pendant l'incubation en mi lieu salin; l'utilisation de l'ALA marqué était au contraire semblable dans les deux conditions. Ceci suggère qu'en présence de fer dans le milieu extérieur la réaction glycine → ALA est plus importante qu'en absence de métal.

3) Etude des mouvements du fer in vitro dans le culot globulaire d'aplasie

Les constatations faites au cours des aplasies paraissent difficiles à expliquer. On a constaté en effet, dans trois cas humains (réticulocytose inférieure à 0,3 %) et chez les rats aplasiés par 450 r in toto et testés au 7ème jour (réticulocytose inférieure à 0,5 %), que la synthèse réelle d'hème par réticulocyte est normale ou supérieure à la normale, et que la fixation de fer et son utilisation (exprimés en poids de fer par réticulocyte) sont presque aussi élevées que dans les réticulocytes jeunes d'hémolyse.

La seule explication valable pour ces constatations est la suivante : dans les aplasies, les réticulocytes malgré leur petit nombre sont d'un âge moyen aussi jeune que dans les hémolyses, que leur libération médullaire précoce soit une compensation de la cytopénie périphérique ou qu'elle soit due à un dysfonctionnement médullaire. Un fait observé in vivo dans les aplasies humaines et expérimentales permet de soutenir cette hypothèse: la courbe d'incorporation globulaire du fer radioactif injecté in vivo s'élève à un niveau faible, mais ce niveau est atteint assez vite, suggérant une libération rapide des quelques cellules que peut manufacturer la moelle aplasiée.

4) Etude des mouvements du fer in vitro dans les réticulocytes d'anémies hypochromes hypersidérémiques

Dix anémies hypo- ou normochromes hypersidérémiques ont été étudiées, mais seules les thalassémies constituent dans ce cadre un groupe homogène. Nous ne ferons donc état que de ces 6 observations de thalassémie majeure. Les faits observés sont indiqués dans le tableau 20.

On constate chez tous ces malades les mêmes anomalies par rapport aux sujets normaux. Alors que la réticulocytose est peu augmentée, la fixation de fer est très augmentée, atteignant les chiffres observés dans les grandes anémies sidéropéniques. Cependant, par comparaison à celles-ci, le pourcentage d'utilisation est faible (20-30 % contre plus de 50 % dans les hyposidérémies); il en résulte une mise en réserve excessive, qui est chiffrée dans la colonne IV du tableau 20. Cette fixation excessive de fer et cette mise en réserve excessive sont en accord avec des observations déjà faites par d'autres (9,93) et avec les dosages chimiques du fer non héminique dans les cellules thalassémiques.

L'observation in vitro d'un taux de synthèse réelle d'hème supérieur à la normale est un fait plus étonnant; il est en contradiction avec les conclusions de BANNERMAN et coll. (9) et de VAVRA et coll. (149). En fait les chiffres publiés par ceux-ci sont variables et comparent la synthèse à partir de glycine de sang de sujets thalassémiques (réticulocytose modérée) et de sang de grandes hémolyses (réticulocytose très élevée), par contre ils trouvent (149) une synthèse d'hème à peu près semblable pour les réticulocytes de thalassémie et les réticulocytes

Tableau 20

UTILISATION DU FER PAR LES RETICULOCYTES DE THALASSEMIE MAJEURE "IN VITRO"

(Résultats exprimés pour 10^7 réticulocytes. Entre parenthèses, chiffres d'un culot globulaire normal étudié le même jour).

Thalassémies	Réticulocytose (en %)	Fixation cellulaire du fer (10^{-5} γ)	Incorporation héminique du fer fixé (%)	Synthèse de l'hémoglobine calculée	
				à partir du fer plasmatique (10^{-3} γ)	à partir de la glycine (10^{-3} γ)
G	3,1	206 (5,6)	28 (7,3)	170 (1,2)	215 (77)
Da	3	44 (7,1)	34 (10)	44 (2,1)	72 (48)
S	3	152 (6,3)	37 (8)	166 (1,5)	360 (148)
P	8	200 (6,8)	33 (16)	194 (3,2)	295 (104)
L	9	47 (17)	19 (15)	27 (7,5)	224 (61)
Dj	1,5	30 (5,6)	14 (6,1)	12 (1)	171 (125)

normaux ou d'anémie hypochrome hyposidérémique (0,22 - 2,1 m μ mole/10^9 réticulocytes contre 0,22 - 0,96 m μ mole /10^9 réticulocytes).

L'interprétation des faits nous paraît devoir être la suivante: il y a un excès de fixation cellulaire du fer mais, alors que les réserves sont déjà normales ou augmentées (16,143), une fraction importante du fer s'engage dans cette voie. Il est aisé de calculer le bilan des mouvements du fer dans les thalassémies par rapport aux autres cas étudiés (tableau 21).

En comparant les colonnes I et III de ce tableau, on voit que le réticulocyte d'une hémolyse est grossièrement en équilibre, que le réticulocyte normal vieilli synthétise de l'hème en épuisant ses réserves, que celui d'une anémie hypochrome sidéropénique augmente sa fixation de fer pour reconstituer ses réserves. Le réticulocyte d'une thalassémie, dont les réserves sont déjà pleines, thésaurise inutilement un tiers du fer qu'il fixe in vitro. L'anomalie de base ne serait donc pas uniquement une insuffisance des possibilités d'utiliser le fer, mais un excès des phénomènes de fixation et de mise en réserve : anomalie qualitative ou quantitative des protéines réceptrices ou excès de fonctionnement enzymatique de la voie allant du récepteur vers les réserves.

L'excès du taux du fer dans les compartiments de réserve (fer trivalent de la ferritine) pourrait être un élément inhibiteur de la synthèse d'hème, par inhibition de la synthèse de l'ALA à partir de la glycine. La synthèse d'ALA à partir de glycine et de succinate requiert la présence de pyridoxal-phosphate; elle se fait dans les mitochondries où s'accumule aussi le fer trivalent de la ferritine; elle comporte une décarboxylation à partir de l'acide α-amino-β-céto-adipique, composé intermédiaire entre la glycine et l'ALA; or on a montré que l'ion ferrique inhibait la réaction de décarboxylation au profit des autres réactions qui se font par l'intermédiaire du complexe pyridoxal-métal-acide aminé.

Il est difficile de comprendre pourquoi nous avons trouvé in vitro une synthèse d'hème normale et même supranormale dans des cellules d'anémie hypochrome thalassémique ayant un déficit congénital de la synthèse hémoglobinique; peut-être les cellules les plus anormales sont-elles surtout médullaires et non viables, donc non explorées dans notre protocole utilisant les cellules circulantes; peut-être aussi les conditions de l'incuba-

Tableau 21

UTILISATION DU FER "IN VITRO" DANS TROIS CATEGORIES DIFFERENTES D'ANEMIES

	I	II	III	IV
	Quantité moyenne de fer fixée pour 10^7 réticulocytes	Quantité moyenne de fer plasmatique utilisée pour l'hème	Quantité moyenne de fer intra et extra-cellulaire utilisée pour la synthèse d'hème	Gain moyen de fer pendant l'incubation en plasma marqué (10^{-5} γ/10^7 rétic.)
Thalassémies majeures (6 cas)	112.10^{-5}	35.10^{-5}	76.10^{-5}	+ 36.10^{-5}
Anémies hypochromes non traitées (14 cas).	132.10^{-5}	43.10^{-5}	58.10^{-5}	+ 74.10^{-5}
Anémies hémolytiques diverses (16 cas) . .	39.10^{-5}	18.10^{-5}	35.10^{-5}	+ 4.10^{-5}
Sujets normaux témoins (27 explorations) . .	$9.6.10^{-5}$	$1.3.10^{-5}$	46.10^{-5}	- $36.4.10^{-5}$

tion, ou l'apport de plasma frais normal, modifient-ils cette lésion biochimique pendant la faible durée de l'expérience.

5) Etude des mouvements du fer in vitro au cours du saturnisme

Nous avons réalisé chez le rat un saturnisme aigu par une seule injection d'acétate de plomb par voie intramusculaire. Trois lots d'animaux ont reçu 100, 200 ou 250 mg/kg et étaient tués à des dates variables du 2ème au 20ème jour suivant l'injection. La synthèse héminique à partir de fer et de glycine est mesurée in vitro et comparée au comportement d'un culot globulaire de rat normal tué le même jour. Dans ces trois expériences, les résultats ont été les mêmes; ceux de l'une d'entre elles sont représentées sur la fig. 5.

Les faits à noter sont les suivants. Les anomalies sont progressives, au maximum après le 10ème jour (fait confirmé dans les deux autres séries d'expériences). La réduction de la synthèse d'hème à partir de la glycine et de celle à partir du fer plasmatique sont sensiblement parallèles; cependant la fixation cellulaire de fer diminue dans des proportions moindres, ce qui se traduit par un taux d'utilisation diminué du fer plasmatique. On en déduit qu'une partie du fer est stockée "inutilement", au moins à l'échelle d'une incubation de trois heures. Cette constatation est à rapporcher de celle faite dans les thalassémies in vitro avec cependant une différence majeure, la baisse en valeur absolue de la quantité d'hème néoformé; elle doit aussi être rapprochée des expériences de ALLEN et JANDL qui ont observé qu'in vitro le plomb inhibait moins la fixation cellulaire du fer que la possibilité du fer d'être mobilisé à partir du stroma vers le compartiment labile ultérieur (2).

6) Mesure de la cinétique intra-cellulaire du fer dans les conditions pathologiques

Les mêmes expériences que celles décrites précédemment de post-incubation en plasma frais après marquage ont été appliquées à l'étude des culots globulaires pathologiques; anémie hypochrome non traitée, saturnisme expérimental du lapin et du rat, cellules ayant incubé au préalable pendant 15 minutes dans une solution d'acétate de plomb (1.10^{-5} à 5.10^{-4} M).

Dans le saturnisme on observe une fixation anormalement élevée dans le stroma; cette activité ne baisse pas pendant la poursuite de l'incubation, alors que l'activité non héminique du surnageant de l'hémolysat diminue lentement. On observe en outre une forte quantité d'activité dans la fraction mitochondriale.

Dans le saturnisme on observe une fixation anormalement élevée dans le stroma; cette activité ne baisse pas, alors que l'activité non héminique du surnageant de l'hémolysat diminue lentement. On observe en outre une forte quantité d'activité dans la fraction mitochondriale.

Dans une thalassémie majeure, on a observé que l'activité non héminique, présente pour 40 % seulement dans le surnageant après 10 minutes d'incubation, se trouvait pour 75 % dans cette fraction après 70 minutes en plasma froid. En outre, l'activité non héminique des mitochondries était ici élevée, atteignant 8 % de l'activité totale.

La figure 6 donne des courbes d'activité non héminique, en fonction du temps de la post-incubation, dans le stroma et le surnageant de ces trois affections. Elle montre bien, par comparaison avec le réticulocyte normal, la rapide utilisation du fer du surnageant dans l'anémie hypochrome, l'accumulation de fer dans le stroma dans le saturnisme, le mouvement du fer stocké, de la membrane vers le surnageant de l'hémolysat, dans la thalassémie.

IV - ACTION DES REDUCTEURS ET DES NUCLEOTIDES DE L'ADENINE SUR LA CINETIQUE GLOBULAIRE DU FER IN VITRO.

Un travail important serait celui permettant de mettre en évidence un blocage spécifique, à une étape précise, des mouvements du fer par l'usage d'un agent chimique déterminé, ou d'un inhibiteur enzymatique précis. De telles constatations auraient un intérêt encore plus grand dans des affections où il existe un trouble manifeste des mouvements du fer dans la cellule. Une telle expérimentation n'a cependant pas encore pu être réalisée; elle exige en effet l'étude de la synthèse héminique dans des milieux acellulaires et l'exploration de l'influence de tel ou tel mode d'apport du fer à un tel milieu pour la synthèse de l'hème.

Nous nous sommes cependant attaché à l'étude de deux agents chimiques. Nous avons étudié l'effet des réducteurs parce que l'on sait que le fer de la ferritine et de la sidérophiline est trivalent alors que celui de l'hème est bivalent, et que les réducteurs potentialisent l'action de l'hème-synthétase qui assure la liaison in vitro du fer à la protoporphyrine; en outre certains ont suggéré que le fer intra-cellulaire devrait être stabilisé par liaison avec des groupes SH pour que l'enzyme hème-synthétase soit active (164). Nous avons étudié les nucléotides de l'adénine parce que certains ont observé un effet favorable de l'A M P in vivo dans les porphyries, où il existe une anomalie de synthèse du groupement porphyrique et parce que l'on sait l'existence d'une diminution de synthèse d'A T P dans les hématies en vieillissement, condition dans laquelle on trouve une disparition de l'utilisation normale du fer. Dans ces deux cas, nous nous sommes jusqu'à présent borné à l'utilisation du même substrat que dans les explorations précédentes : réticulocytes intacts humains ou animaux, mais non pas des systèmes acellulaires.

1) Action des réducteurs

La cystéine-SH, le gluthation réduit (G-SH), l'acide ascorbique à un moindre degré, ont la même action : peu ou pas d'action sur la fixation globulaire du fer (légèrement augmentée), peu ou pas d'action sur l'utilisation du fer du plasma (légèrement diminuée), nette augmentation de la synthèse d'hème à partir de la glycine -2-C 14 et baisse dans les mêmes conditions de l'utilisation héminique de l'ALA 4-C 14 (Tableaux 2 et 22). Ces produits étaient utilisés en incubation avec les cellules avant la mise en présence du traceur radioactif, ou en même temps que le traceur.

On en déduit les conclusions suivantes :

- Les réducteurs favorisent la synthèse en favorisant la synthèse d'ALA de novo, étape essentielle de la chaîne de synthèse porphyrinique, comme on l'a souligné dans un chapitre précédent.

- Le fer utilisé pour cette synthèse accrue n'est pas celui extérieur (voie directe), mais celui des réserves. Cela confirme une fois de plus l'indépendance des deux mécanismes, celui de la synthèse et celui de la voie directe

Tableau 22

UTILISATION DU FER ET SYNTHESE HEMINIQUE EN PRESENCE DE CYSTEINE-S H

(Sang humain normal). Incubation de 3 heures en plasma marqué

Cystéine SH Molarité	0	$0,2\text{-}10^{-3}$	$0,5\text{-}10^{-3}$	$1\text{-}10^{-3}$	$2,10^{-3}$	$5\text{-}10^{-3}$
Fixation de fer (coups / mn)	130	138	158	183	163	148
Utilisation héminique de fer (coups/mn)	45	44	40	32	34	35
Utilisation héminique de glycine (coups/mn)	186	317	540	705	710	497
Utilisation héminique d'ALA (coups/mn)	1580	1470	1360	960	860	1097

d'utilisation; cela montre la souplesse du système, la présence du pool "de réserve" permettant la non-dépendance directe de la synthèse d'hème et de l'entrée du fer.

Les molarités où l'activité est maxima sont les suivants :

cystéine S-H : 1 à 2.10^{-3} M

glutathion S-H : 1 à 2.10^{-3} M

acide ascorbique : 2.10^{-3} M

L'augmentation de synthèse de l'hème à partir de la glycine atteint 100-250 % avec le gluthation et la cysteine dans des culots globulaires humains normaux, c'est-à-dire où les réticulocytes sont peu nombreux et âgés; l'augmentation n'est que de 50-100 % dans des culots plus "jeunes" (anémie hémolytique humaine, cellules rouges de lapin); l'augmentation observée avec l'acide ascorbique est plus modeste encore, 20-50 %.

On a étudié l'effet des réducteurs dans des thalassémies majeures et on a constaté les mêmes faits que chez le sujet normal. Dans ces cas du fer du pool de réserve peut donc être utilisé à la synthèse d'hème, ce qui a peut être un intérêt thérapeutique, mais n'a pas été confirmé in vivo. Dans le saturnisme expérimental, nous n'avons pas observé d'amélioration de la synthèse d'hème par incubation en présence de gluthation; d'ailleurs, si le gluthation relève l'activité de l'ALA-déhydrase abaissée par le plomb (166), il n'a pas d'effet sur les autres anomalies enzymatiques; ainsi la synthèse des porphyrines n'est pas améliorée (166).

ACTION DES NUCLEOTIDES DE L'ADENINE

L'action de l'adénosine, de l'AMP, de l'ADP et de l'ATP a été étudiée sur des culots globulaires intacts d'homme normal, de lapin normal, et d'anémie hémolytique d'homme et de lapin. Les molarités utilisées étaient de 0,5 à 8.10^{-3}. L'effet était toujours nul pour l'adénosine et l'ATP. Avec l'AMP et l'ADP on observait une très légère augmentation de l'utilisation héminique du fer; celle-ci était cependant très inconstante d'une expérience à l'autre.

On a cherché si l'adjonction au plasma d'AMP (1.10^{-3} M) permettait d'augmenter la synthèse d'hème à partir de glycine ou d'améliorer l'utilisation du fer dans les hématies de rats rendus saturnins par injection de sel de plomb. Aucune différence n'a été notée dans les culots globulaires incubant en présence d'AMP par rapport à ceux incubant en l'absence de ce produit.

Chapitre 4

DISCUSSION

DISCUSSION

Les conclusions concernant la cinétique intra-cellulaire du fer sont essentiellement fondées sur deux types principaux d'expériences : la comparaison entre synthèse d'hème à partir du fer extérieur et synthèse d'hème à partir de glycine -2-C 14, l'étude de la vitesse de disparition du fer non héminique après mise en incubation des globules marqués dans un plasma frais. Les conclusions dégagées dans ce travail ne sont cependant valables que si les expériences elles-mêmes sont valables.

1) Validité de l'expérimentation

La glycine est le substrat normal utilisé pour la synthèse porphyrinique; la glycine ajoutée au milieu extérieur pénètre parfaitement et rapidement dans les cellules. L'absence d'adjonction de glycine au milieu extérieur permet néanmoins l'utilisation héminique du fer, la synthèse d'hème se faisant alors à partir du pool métabolique intra-cellulaire (149) d'acides aminés libres (173), suffisant pour une épreuve in vitro de quelques heures; de même notre expérience a confirmé que la synthèse d'hème à partir de glycine -2-C 14 n'est pas fonction de la quantité de glycine amenée dans le milieu extérieur (75).

Ce pool intra-cellulaire de glycine, qui permet de considérer la glycine marquée ajoutée comme un véritable traceur, doit être pris en considération dans les calculs, malgré l'opinion de certains (9). Sa quantité est cependant diversement estimée, de 3 mg pour 15 ml de sang (36), à 2,5 mg pour 100 ml de culot cellulaire (5); encore doit-on noter que seuls les réticulocytes nous intéressent et que leur taux de glycine libre est plus élevé que celui des cellules mûres (1). Il y a cependant une utilisation préférentielle de glycine libre par rapport à la glycine peptidique pour la synthèse de l'hème (23,153), ce qui permet de ne compter comme pool cellulaire de glycine que la

glycine libre, et éventuellement la très petite quantité de sérine avec laquelle elle s'échange. A cause de l'existence de ce pool intra-cellulaire, difficile à mesurer exactement, les calculs de synthèse réelle d'hème à partir de la glycine sont seulement approximatifs. Cependant ceux que nous avons faits s'accordent avec ceux des autres auteurs ayant utilisé les mêmes techniques, à de très faibles variations près (9,149).

Au contraire, l'étude de la synthèse d'hème à partir de l'acide delta-amino-lévulinique donne des résultats inutilisables pour l'étude quantitative de la synthèse physiologique. D'une part la synthèse plus élevée à partir d'ALA -4-C 14 dans des hémolysats que dans des cellules intactes (149) suggère une mauvaise pénétration à travers la membrane, ce qui a été prouvé par ailleurs (132). Mais surtout on peut noter que la synthèse d'hème à partir d'ALA est nettement plus élevée qu'à partir de glycine, ce qui a été vérifié par d'autres (149), et ce qui confirme que l'étape initiale de la synthèse porphyrinique est bien l'étape capitale (49, 55). L'utilisation d'ALA extérieur pour mesurer la synthèse d'hème est donc non-physiologique.

La différence entre le taux de synthèse d'hème à partir de glycine et de fer est confirmée dans d'autres travaux (9,149). Elle n'est pas due à une surestimation du taux de synthèse à partir de glycine, mais à une sous-estimation de la synthèse à partir du fer. Cette sous-estimation nous a conduit à proposer deux hypothèses : une mobilisation insuffisante à partir du récepteur de la membrane, une dilution du fer extérieur dans le pool des réserves intra-cellulaires.

L'étude de la disparition du fer non héminique en fonction du temps, par incubation dans un plasma frais, exige qu'il n'y ait pas d'échange entre le fer fixé et le fer du plasma ajouté. Un tel échange a cependant été observé (101, 118) et a servi à justifier la notion de pool labile érythropoïètique du fer. Si nous n'utilisions pas des culots globulaires d'hématies mûres, et si nous ne mettions en incubation qu'un culot soigneusement lavé, nous ne constations pas un tel échange; aucune sortie mesurable de fer n'a été non plus observée par d'autres (2); cet échange très faible est surtout observé après fixation non spécifique à 0° (101); il existait pour certains après marquage in vitro et non après marquage in vivo (107) ce qui suggère une fixation non spécifique dans le premier cas. L'absence d'échange quan-

titativement décelable entre le fer fixé et le plasma neuf permet donc de tenir compte des résultats des expériences de post-incubation.

Il est évident que les conclusions présentées ne valent que pour la cinétique du fer in vitro. Celle-ci n'est pas forcément l'image de ce qu'elle est in vivo, où la structure de l'ilôt érythroblastique (14) permet l'éventuelle fourniture à l'érythroblaste de matériel protéique, voire de fer. On peut cependant développer deux arguments qui indiquent que les expériences faites in vitro pendant un temps court sont représentatives de ce qui se passe réellement in vivo. In vitro le réticulocyte gagne une charge d'hémoglobine à peu près semblable à ce qu'on sait qu'il gagne in vivo pendant la même durée de temps. D'autre part, dans la mesure où l'expérience était possible, on confrontait systématiquement chez l'homme les données de la cinétique du fer in vivo et in vitro; on observait une bonne concordance entre les résultats des deux épreuves.

2) Vieillissement cellulaire

La constatation d'une poursuite de la synthèse héminique à partir de la glycine dans le réticulocyte âgé, alors que le fer extérieur n'est plus utilisé bien que se fixant à la cellule, a pu surprendre. Ce fait est cependant constamment observé et s'explique si on admet que la cellule vieillie est capable d'utiliser du fer de sa réserve, mais non de mobiliser le fer de la membrane.

Ces observations concordent avec les faits suivants. La synthèse réelle d'hème par réticulocyte est la même, qu'on utilise ou non un culot très riche en réticulocytes (149), alors que celle d'hème à partir du fer n'est pas parfaitement parallèle au taux des réticulocytes (104). La synthèse porphyrinique (à partir de la glycine) continue chez des animaux irradiés plus longtemps que celle d'hème à partir de fer (75). Les mesures microspectrophotométriques montrent que la cellule rouge jeune fixe plus de fer qu'il ne lui en est immédiatement nécessaire (138). La microscopie électronique montre que le fer des réticulocytes de la moelle est plus abondant que celui des réticulocytes circulants (16). La cellule complètement mûre contient encore les enzymes solubles nécessaires à la transformation de l'ALA en porphyrines, mais pas les deux chaînons extrêmes du cycle, ALA-synthétase et hème-synthétase, tous deux liés

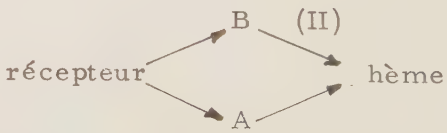
aux mitochondries (81, 94); la synthèse d'hème à partir de glycine est possible tant qu'il y a des mitochondries, ce qui est le cas des réticulocytes. Dans la conception de Matioli (167), le vieillissement se marque par une diminution de la pénétration intra-cellulaire du fer libre; la synthèse de novo d'apoferritine est alors réprimée et le fer de réserve utilisé, puisque l'ARN messager pour la synthèse d'hémoglobine est encore suffisant. Cette théorie cadre bien avec nos observations.

Nous avons en effet observé que le vieillissement entraîne une impossibilité de mobiliser le fer fixé aux cellules et, secondairement seulement, une suppression de cette fixation. Cela est montré par la mesure du pourcentage de fer incorporé à l'hème selon qu'on utilise un culot cellulaire riche en réticulocytes (cellules jeunes) ou un culot normal (cellules âgées). Dans le cas d'un culot globulaire humain normal, l'utilisation héminique du fer est seulement de 20 à 40 % (2,98,103). Ce taux insuffisant d'utilisation n'est pas dû à un simple ralentissement de celle-ci : en prolongeant plusieurs heures l'incubation, on observe réellement un plateau.

La fixation inefficace d'une petite quantité de fer doit être prise en considération dans les expériences de post-incubation en plasma marqué. On doit tenter dans chaque cas de déterminer par une incubation très longue d'un échantillon la quantité de fer non-héminique ainsi "gelée". La correction à apporter ainsi sera d'autant plus importante que la réticulocytose sera plus faible.

3) Cinétique intra-globulaire in vitro. Existence de compartiments intra-cellulaires multiples.

L'analyse des courbes de renouvellement du fer non héminique intra-cellulaire nous a conduit à admettre l'existence non pas d'un seul, mais de deux précurseurs de l'hème, selon l'un des deux schémas suivants :



où A est petit avec un renouvellement rapide, et B est grand avec un renouvellement lent. Ce serait le pool de "réserve" B

qui serait utilisé par le réticulocyte pour parfaire sa synthèse d'hème alors même que l'utilisation du fer extérieur n'est plus possible ou est très faible.

Cette conception métabolique s'appuie sur des données cinétiques non discutables. D'autres auteurs ont observé, in vitro aussi bien qu'in vivo, que l'activité héminique s'élève d'abord rapidement puis lentement (28,95,161), ou que l'activité non héminique baisse d'abord vite, puis lentement (143). Mais ces faits pourraient recevoir d'autres interprétations que celle présentée : ralentissement d'utilisation du fer au cours de l'incubation, ralentissement du transfert du fer de la membrane au pool non-héminique, existence de deux populations cellulaires à cinétique différente.

Il ne peut cependant pas s'agir d'un ralentissement de la synthèse d'hème, puisque la synthèse réelle, mesurée à partir de la glycine, continue régulièrement tandis que l'utilisation du fer fixé s'infléchit. Une anomalie du transfert de fer de la membrane à la fraction soluble de la cellule n'est pas non plus admissible ; le pool volumineux est en effet en grande partie localisée dans le surnageant de l'hémolysat; un second marquage avec un second isotope du fer (Fer 55) nous a montré que la voie directe rapide de transfert du plasma à l'hème continue à être praticable alors que le fer 59 du premier marquage n'est plus utilisé que lentement. Enfin le fait que nous avons toujours trouvé le même type de courbe, en utilisant des culots cellulaires très riches, moyennement riches ou peu riches en réticulocytes, aussi bien chez le lapin que chez le rat ou l'homme, prouve que cette courbe bi-exponentielle de disparition du fer non héminique n'est pas due à la coexistence de deux populations cellulaires dont la cinétique du fer serait différente.

La déduction de l'existence de plusieurs compartiments métaboliques du fer s'appuie encore sur des données expérimentales apportées par d'autres techniques, notamment cytologiques et chimiques.

La microscopie électronique, qui ne peut malheureusement pas être dynamique, montre que le fer ferritinique se trouve dans la cellule sous diverses formes (16), fins granules dispersés ou micelles volumineuses; ces deux états pourraient avoir une cinétique de renouvellement très différente.

Les méthodes chimiques ont montré que le fer des membranes est en partie ferreux, en partie ferritinique (143). L'électrophorèse a montré dans la moelle l'existence d'une fraction non héminique qui migre différemment de la ferritine (126) : son activité augmente en même temps que celle de l'hémoglobine, ce qui suggère que cette protéine n'est pas un précurseur direct de l'hémoglobine (127). D'autres techniques d'électrophorèse (41) et de chromatographie d'échange d'ions (57, 62) ont aussi mis en évidence une protéine non héminique, rapidement marquée par le radio-fer, apparemment différente de la ferritine. Dans la muqueuse intestinale on a pu montrer que le fer s'incorporait à deux pools différents, un petit complexe d'amino-acides à renouvellement rapide, et une protéine de grande taille à renouvellement lent, différente de la ferritine (25); cependant la cellule de la muqueuse intestinale contient, comme la cellule rouge, de la ferritine dont le taux augmente lors de la surcharge (31).

Nous avons pu nous-même, en utilisant la chromatographie de partition sur Sephadex et la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose avec un gradient de molarité mais sans gradient de pH, isoler deux formes non héminiques du fer (fig. 7 A et B). L'une d'elles contient la majeure partie de l'activité; cette activité baisse cependant progressivement, alors que celle de l'hème augmente quand on chromatographie successivement des échantillons d'un culot globulaire marqué ayant incubé un temps variable en plasma froid. L'autre fraction n'est bien visible que dans les expériences où la synthèse a été bloquée par CNK; elle parait pouvoir être identifiée au pool virtuel A à renouvellement rapide dans les cellules où la synthèse héminique a lieu. Ces résultats préliminaires tendraient à faire identifier les deux fractions isolées comme étant les deux fractions mises en évidence par l'étude cinétique.

La nature chimique de ces protéines n'est pas actuellement connue. Aucune d'elles ne paraît être la ferritine puisqu'elles en diffèrent par leur migration électrophorétique, leur non-précipitation en sulfate de cadmium, leur dénaturation à 80° centigrades, leurs caractéristiques de migration en Sephadex ou en résine échangeuse d'ions, leur non-précipitation par un sérum spécifique antiferritine (25,57,91,126 et observations personnelles). D'ailleurs, du point de vue cinétique, la ferritine paraît pouvoir difficilement céder son fer à l'hème (160) et peut perdre du fer radioactif sans que l'hème en gagne (95).

Dans les expériences de ZAIL et coll. (161), l'activité de la ferritine ne diminue pas pendant une incubation en plasma froid.

Mais il existe en outre une radio-activité cellulaire non utilisable à l'échelle des quelques heures de l'incubation in vitro. Il ne s'agit probablement pas de fer fixé de façon spécifique, puisque, même en utilisant des culots cellulaires très riches en réticulocytes, l'utilisation pour l'hème ne dépasse pas 80 %. D'autre part cette activité n'est pas dialysable, et ne s'échange pas avec le fer non radio-actif du plasma. In vivo une petite quantité de radiofer est non héminique, plusieurs jours après l'injection du traceur. Il est possible qu'il existe une petite quantité de fer réellement mise en réserve, difficile à déceler par l'étude cinétique à cause de mouvements très lents; elle n'entrerait pas en compte dans les calculs de synthèse de l'hème in vitro à cause de ces mouvements très lents; ou bien même elle ne participerait pas du tout à la synthèse d'hème et participerait au pool de réserve identifié in vivo et discuté dans la seconde partie de cet ouvrage; ce fer serait peut-être remis à la disposition du transporteur plasmatique par le système d'élimination spénique décrit par CROSBY in vivo (30) bien que des expériences faites chez l'animal splénectomisé tendent à nier l'existence de ce phénomène (161); on a suggéré que la disparition de ce fer pourrait se faire dans la moelle, via la cellule réticulaire, par le mécanisme de pinocytose décrit par BESSIS (15), mais fonctionnant en sens inverse de ce que pense cet auteur. L'identification d'une telle réserve peu mobile à la ferritine n'est pas encore assurée.

4) Localisation des compartiments métaboliques du fer

Notre expérimentation n'a pas montré de fixation importante de radio-fer dans les mitochondries ni dans les microsomes. L'activité des mitochondries, chez le sujet normal, ne dépassait pas 3 % de l'activité non héminique totale, et décroissait au même taux que l'activité du stroma; celà s'accorde avec les faits cités par ALLEN et JANDL (2) et suggère que la mitochondrie participe seulement pour une faible part aux mouvements du compartiment diffus de renouvellement lent. L'activité des microsomes était elle aussi très faible dans les lysats cellulaires et nous n'avons pas observé l'accumulation particulaire de fer observée par d'autres (122) utilisant, il est vrai, un système acellulaire et non des cellules intactes; il est possible que la synthèse d'hème se fasse au niveau du microsome

de façon si rapide qu'aucune accumulation de fer ne puisse y être décelée, tandis qu'en milieu acellulaire l'hème synthétisé sur les ribosomes ne s'en détache que lentement.

La majeure partie de l'activité est dans le stroma et le surnageant. Après d'autres (2), on a pu observer une baisse d'activité du stroma précédant celle du surnageant. On trouve d'autre part dans le stroma solubilisé par le désoxycholate de sodium le même diagramme de chromatographie en résine échangeuse d'ions (DEAE-cellulose, gradient de molarité) qu'à partir du surnageant de l'hémolysat.

5) Anomalies pathologiques de la cinétique du fer in vitro

Une meilleure connaissance des compartiments non héminiques intra-cellulaires du fer permettrait certainement d'éclairer le mécanisme de diverses érythropaties avec surcharge cellulaire de fer. L'usage de divers agents pharmacodynamiques pourrait servir à créer des modèles de troubles métaboliques à l'échelle cellulaire.

Trois états pathologiques nous ont spécialement intéressé : l'hyposidérémie, la thalassémie et le saturnisme.

Le réticulocyte d'anémie hypochrome hyposidérémique est désaturé en fer non héminique. Il fixe à grande vitesse le fer extérieur in vitro, comme il le fait in vivo, ce qui est une des preuves que la fixation globulaire du fer dépend au premier chef du degré de désaturation du récepteur de la membrane. Deux autres faits ont été notés. Même en présence d'un plasma à saturation en fer normal la synthèse vraie d'hème à partir de la glycine n'est pas augmentée (la synthèse apparente à partir du fer plasmatique est élevée, parce que le fer ne se dilue pas dans des compartiments intermédiaires vides). D'autre part il existe une mise en réserve nécessaire et rapide; dès le 10ème jour du traitement, les compartiments non héminiques sont normaux alors qu'à cette période les réserves générales "labiles" de l'organisme, mesurées in vivo, sont encore très faibles.

Ces deux faits s'accordent avec les données de la littérature. La présence de fer augmente sensiblement, dans les systèmes acellulaires, la synthèse porphyrinique (71, 149, 150). On ignore à quel niveau joue le fer; son action comme cofacteur de l'aconitase, et de l'ALA-synthétase, ne sont que des supposi-

tions (150). Son rôle n'est sûrement que partiel, puisqu'il existe une hyperprotoporphyrie globulaire libre dans les hyposidérémies (159).

La synthèse in vitro de l'hème dans les globules rouges de thalassémiques a fait l'objet d'importants travaux (9, 149). Nos observations aboutissent aux conclusions suivantes. La fixation, par réticulocyte, de fer extérieur est élevée et, compte tenu d'une utilisation partielle, le bilan du fer est positif; ceci s'accorde avec des constatations faites in vitro (93) et avec tous les résultats des épreuves faites in vivo qui montrent un turnover accéléré du fer et une utilisation défectueuse. La synthèse d'hème à partir de la glycine n'était pas diminuée, contrairement aux observations de BANNERMAN (9) et de VAVRA (149); ces derniers avaient en effet observé, dans des expériences où la glycine était amenée en milieu salin, une médiocre synthèse d'hème alors que cette synthèse était élevée si le milieu extérieur amenait de l'ALA marqué (149); un blocage sur la voie métabolique glycine $\longrightarrow$ ALA en était déduit, ce qui s'accorde avec l'excellente utilisation de la proporphyrine -C 14 en milieu acellulaire par ces mêmes cellules (58). Le caractère partiel du blocage métabolique observé par ces auteurs, les variations assez grandes des chiffres de synthèse d'hème par cellule d'une expérience à l'autre, le fait qu'on utilise in vitro des réticulocytes alors que les cellules les plus touchées meurent dans la moelle et ne sont donc pas étudiées, peuvent expliquer ce désaccord. Enfin on a observé, dans les expériences de post-incubation en plasma froid, que le fer fixé suivait normalement la voie métabolique rapide, suggérant l'absence de blocage de cette voie d'utilisation du fer. La seconde courbe, par contre, n'était pas visible, ce qui pourrait signifier soit un blocage de la mobilisation du fer à partir du compartiment de gros volume, soit simplement une dilution très grande du traceur dans un compartiment hypertrophié. On notait en outre un taux anormalement élevé de fer dans les mitochondries, ce qui s'accorde avec les observations faites en microscopie électronique (16). Les réducteurs ne changeaient pas l'utilisation du fer extérieur.

Les observations faites sur la thalassémie ont l'intérêt de mettre l'accent sur le trouble de synthèse de l'hème, alors que beaucoup ne voient dans cette affection qu'une anomalie quantitative de synthèse de la globine. Une anomalie quantitative de

synthèse de globine in vitro a été observée par NECHELES et BALDINI (Blood, sous presse) par comparaison avec des cellules normales. Certes certains faits suggèrent que la globine est un activateur de la synthèse de l'hème (131) ou qu'un complexe globine-fer précéderait la liaison fer-protoporphyrine (57). En fait, si on comprend aisément qu'un déficit de synthèse de globine entraîne une non-utilisation de fer, on saisit mal que dans ce cas la pénétration globulaire du fer soit augmentée, alors que les réserves sont déjà pleines. L'excès de fer des mitochondries pourrait d'ailleurs être un agent inhibant les réactions de synthèse qui se font dans ces particules; ce sont précisément les deux étapes enzymatiques à localisation mitochondriale, synthèse d'ALA et synthèse d'hème à partir de la protoporphyrine, qui sont partiellement inhibées dans cette affection. Le trouble réel du métabolisme du fer dans la thalassémie majeure est probablement capital et n'est pas actuellement bien compris.

Le saturnisme offre le meilleur exemple actuel d'un trouble du métabolisme du fer réalisable expérimentalement. L'anomalie la plus importante est l'inhibition de synthèse de l'hème; mais la fixation du fer est inhibée à un degré moindre, d'où une accumulation inutile de fer en réserve. L'anomalie de synthèse porphyrinique est discutée : portant sur la conversion de protoporphyrine en hème (58,149,163), sur une étape ultérieure à l'ALA et antérieure à la protoporphyrine (38), sur la synthèse d'ALA, ou simultanément sur plusieurs de ces étapes (149,162,166). Nous avons observé une fixation de fer anormalement élevée, compte tenu de la synthèse porphyrinique; ce fer n'était pas bloqué, comme d'autres l'ont observé (2), au niveau des membranes; mais l'utilisation du fer se faisait par la seule voie directe, le fer du compartiment de grand volume paraissant complètement bloqué. Il n'y avait pas d'accumulation dans les mitochondries (à vrai dire fragiles et difficiles à isoler des membranes - 91 -), ceci s'accordant avec la non accumulation de fer dans ces organites en microscopie électronique (16). Selon certains (167) il y aurait dans le réticulocyte de l'animal saturnin une stimulation anormale de la synthèse d'apoferritine aboutissant à une déviation des mouvements du fer dans la cellule dans le sens de la mise en réserve. Le blocage des mouvements d'une partie du fer non héminique paraît constituer l'anomalie fondamentale du saturnisme (2,68,91).

On sait qu'en milieu acellulaire la nature bivalente du fer (80,160), la présence de réducteurs (52,81,85,115), celle d'énergie et d'un enzyme normalement fournis par mitochondries, sont nécessaires pour une synthèse héminique efficace. Il serait du plus grand intérêt de déterminer in vitro lequel de ces facteurs pourrait réduire l'anomalie du mouvement du fer dans le saturnisme et dans la thalassémie.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DU FER DANS L'ORGANISME VIVANT

Des progrès physiologiques très importants ont été amenés par l'introduction des techniques isotopiques in vivo. Celles-ci en effet permettent des mesures quantitatives précises que ne donnent pas les méthodes chimiques de bilans. Elles autorisent des mesures dynamiques sur l'organisme vivant. Enfin, grâce au fait que le radio-élément est un traceur injecté en très faible quantité, l'équilibre normal du système vivant à étudier n'est pas modifié au cours de l'exploration.

Parmi les radio-éléments, l'idéal est celui qui n'est utilisé que dans une seule espèce protéique, ou dans une seule espèce cellulaire. C'est le cas de l'iode, qui explore électivement la physiologie thyroïdienne, et c'est le cas du fer, qui n'est utilisé que pour l'hémoglobine (son utilisation pour les enzymes est quantitativement négligeable, et le renouvellement de la myoglobine est si lent que son rôle quantitatif dans les mouvements du fer de l'organisme est très faible).

Le radio-fer 59 a de nombreux avantages pour l'exploration in vivo. Sa période est assez courte pour qu'il ne constitue pas un danger pour le receveur, et assez longue pour qu'il permette une exploration prolongée. Son émission gamma puissante lui permet d'être compté avec un bon rendement au compteur à scintillation, et permet aussi la détection en dehors de l'organisme, autorisant ainsi des mesures répétées au-dessus d'un organe chez un sujet vivant. Certaines expériences peuvent bénéficier de l'emploi simultané des deux isotopes 59 et 55, injectés sous une forme chimique différente; leur discrimination est possible si l'on dispose d'un scintillateur liquide.

Dans les schémas métaboliques habituels du métabolisme du fer, on ne connaît que trois compartiments dynamiques : celui de transport, celui de réserve, celui d'utilisation. L'étude précise du renouvellement du radio-fer a montré que ce schéma

n'était pas exact et que d'autres compartiments, non seulement existent, mais encore s'échangent de façon active avec les précédents; l'obligation de tenir compte de ces compartiments modifie de façon importante la mesure des taux de synthèse d'hème et de mise en réserve du fer.

C'est à la mise en évidence de ces compartiments dynamiques, au calcul de leur volume et de leur vitesse de renouvellement, à la détermination de leur siège que ce travail sera consacré.

Tout modèle exige qu'il soit utilisable dans toutes les espèces et dans toutes les circonstances physiologiques et pathologiques ; par exemple une courbe expérimentale qui dépendrait exclusivement de la fixation de fer à l'appareil érythropoïètique doit disparaître en cas d'aplasie complète, une courbe témoignant de la mise en réserve de fer doit être observée dans toutes les hémochromatoses; dans le cas contraire l'interprétation des courbes en question devrait être reconsidérée. C'est pourquoi notre travail s'appuie non seulement sur les résultats obtenus chez l'homme et l'animal normaux, mais aussi sur les faits observés dans les conditions pathologiques. Nos conclusions sont tirées de l'étude cinétique faite dans 480 cas normaux ou pathologiques (au point de vue hématologique) chez l'homme, et dans 30 séries de chacune 12 à 15 rats normaux ou porteurs d'une affection expérimentale.

Chapitre 1

METHODE D'UTILISATION DU RADIO-FER CHEZ L'ANIMAL ET L'HOMME

La méthode utilisée pour permettre une analyse valable des courbes de décroissance d'activité plasmatique et des courbes d'incorporation globulaire après injection de plasma marqué par le fer 59 ont été décrites par ailleurs (106 bis, 120, 176). Par comparaison avec les méthodes plus anciennes (66), elle impose quelques modifications qui seront seules envisagées dans ce chapitre.

1) Dose de fer injecté

La dose de fer à injecter est décidée en fonction de deux considérations. Il est nécessaire que l'activité des échantillons biologiques prélevés soit suffisante pour que les chiffres donnés par les mesures ultérieures soient statistiquement significatifs; comme on cherche notamment à prolonger les courbes de décroissance plasmatique aussi loin que possible, une dose assez importante est souhaitée. A l'inverse, chez l'homme, il est souhaitable que le sujet récepteur reçoive une quantité de radioactivité aussi faible que possible. L'étude mathématique de l'irradiation du corps à partir du radio-fer a été faite (13, 22, 110) En pratique nous utilisons une dose d'environ 0,3 millicrocurie par kg chez l'homme, qui est suffisante pour dresser des courbes précises d'évolution de l'activité circulante.

2) Mesure de la décroissance de l'activité plasmatique

Cette mesure exige autant de prélèvements que possible si on souhaite dresser la courbe, toujours complexe, avec autant d'exactitude que possible. Il est nécessaire de disposer d'au moins six points expérimentaux dans les 6 heures qui suivent l'injection. Il est utile de connaître le diagnostic probable chez le patient; en cas d'aplasie, où le renouvellement du fer est lent, un étalement des 6 prélèvements sur 8 ou 9 heures permettra de mieux dégager une courbe exponentielle tardive; en cas d'hyposidérémie, où le renouvellement du fer plasmatique est rapide, les six points expérimentaux peuvent être échelonnés sur les 5 premières heures. Les jours suivants, il est nécessaire de disposer de deux points d'activité plasmatique, vers les 20ème et 30ème heure, et d'un point chaque deux jours jusqu'au 14ème jour. L'activité des derniers points doit être comptée pendant un temps suffisamment long, dans un compteur doté d'un spectomètre de telle sorte que le mouvement propre soit aussi bas que possible.

Les taux d'activité sont reportés sur coordonnées logarithmiques. Dans tous les cas (67, 106, 119, 134), on constate que la décroissance ne se fait pas selon une droite simple. Pour tracer la courbe réelle, il est d'abord nécessaire de déterminer l'activité plasmatique résiduelle au 14ème jour, qu'on considère comme due à l'équilibre plasma ⟶ réserves; le pool de réserve étant très grand par rapport au plasma, on considère cette activité d'équilibre comme constante pendant toute l'épreuve et on soustrait l'activité présente au 14ème jour de tous les

autres points expérimentaux. Cette correction faite, on trace les courbes exponentielles successives, en commençant par la dernière et en corrigeant tous les points situés au-dessus de celle-ci. Cette méthode purement graphique permet de mettre en évidence chez le sujet normal deux courbes exponentielles et d'en mesurer la pente et le pourcentage respectif par rapport à l'activité totale injectée.

Il est parfois difficile de calculer exactement les composantes exponentielles de la courbe expérimentale. Certains (176) admettent l'existence d'une composante intermédiaire entre la décroissance initiale rapide et la décroissance lente; mais cette décomposition complexe de la courbe expérimentale ne paraît pas valable. D'autre part on observe très souvent, à la 30ème - 40ème heure, une minime augmentation de l'activité plasmatique probablement due à la remise en circulation de fer à partir d'érythroblastes détruits dans la moelle, comme on admet que cela existe physiologiquement (83); cela gêne l'établissement rigoureux de la seconde exponentielle de la courbe expérimentale.

Dans les cas pathologiques, une composante exponentielle se dégage entre la courbe initiale et la courbe lente tardive. Elle peut être tracée à partir des points les plus tardifs du premier jour et des points expérimentaux de la 20ème et de la 30ème heure. S'il existe un doute sur le nombre d'exponentielles à tracer, il est logique de se demander à l'avance quel type de courbe on doit chercher (135, 145); on s'aide pour celà des données cliniques en sachant qu'un système de trois exponentielles est généralement observé dans les hémochromatoses, les insuffisances médullaires graves, les anémies hypochromes sidéropéniques en traitement.

3) Mesure du volume plasmatique

En extrapolant au temps 0 la première partie de la courbe de décroissance plasmatique de la radioactivité, on détermine la radioactivité théoriquement présente dans un ml de plasma à ce moment. Le volume plasmatique, en ml, est le quotient de l'activité injectée par l'activité présente dans un ml de plasma au temps initial. En fait, le volume plasmatique déterminé par le fer radioactif est souvent assez nettement supérieur (d'environ 10 p. 100) au volume plasmatique théorique ou à celui détermi-

né par une autre méthode (volume de diffusion de l'albumine marquée par 131 I, ou volume total mesuré par dilution des hématies marquées au 51 Cr suivi de calcul du volume plasmatique à partir de l'hématocrite corrigé). Ceci pourrait être du à la disparition rapide d'une partie du traceur non ou mal lié à la sidérophiline (99), mais cette anomalie est observée aussi bien chez les sujets hypersidérémiques (où le fer a toute raison d'être parfaitement fixé, ce que montrent d'ailleurs des autoradiographies de bandes d'électrophorèses du plasma marqué où l'activité est uniquement liée aux bêta-globulines). On peut donc penser que ce phénomène est dû à un espace de diffusion de la sidérophiline plus important que le volume plasmatique circulant. L'échange rapide démontré entre la sidérophiline marquée à l'iode 131 et au fer radio-actif, entre le plasma et la lymphe du foie,est un argument en faveur de cette hypothèse (117). L'enregistrement de l'activité circulante en fonction du temps dans les 10 minutes qui suivent l'injection du traceur nous a montré constamment des courbes du type de celles indiquées sur la fig. 8; ces courbes sont compatibles avec l'hypothèse d'un équilibre rapide entre le compartiment circulant et un compartiment extra-circulant de petite taille (cette "taille" signifiant, non pas le volume des compartiments, mais la quantité totale de sidérophiline qu'il contient).

Le volume circulant total de l'organisme peut être déterminé simultanément et réellement par une autre méthode (albumine iodée, dilution des hématies marquées par 51 Cr). Mais, sur le plan quantitatif, c'est le volume "plasmatique" déterminé par le fer radio-actif qui doit être pris en considération, car il mesure l'espace réel de diffusion de la sidérophiline marquée.

4) Mesure du pourcentage d'incorporation globulaire

Le pourcentage d'incorporation globulaire du fer est mesuré à partir de la quantité de radioactivité réellement injectée, du volume sanguin circulant (et dans ce cas c'est le volume réel, déterminé par le chrome radioactif, qui doit être pris en considération), et des chiffres de radioactivité de chacun des échantillons de sang prélevé dans les jours qui suivent l'injection du radio-fer. La courbe doit être suivie jusqu'à ce qu'elle atteigne un plateau, qui est en général entre 75 et 85 % chez le sujet normal vers le 10ème au 14ème jour. C'est le chiffre d'incorporation au moment où le plateau est atteint qui doit être pris en considération pour les calculs quantitatifs. Aussi

deux cas particuliers doivent-ils être envisagé. D'une part, dans les cas où il existe un important trouble de maturation médullaire et peut-être aussi un retard de cette maturation (11, 88, 151), on observe une montée permanente et régulière de l'activité dans le sang circulant jusqu'au delà du 14ème jour; nous n'avons ainsi observé le maximum d'incorporation qu'au 24ème jour dans le cas d'une maladie de Biermer non traitée; dans les cas de ce type c'est le chiffre maximum d'incorporation et non pas le chiffre d'incorporation au 14ème jour qui doit être pris en considération. D'autre part, dans certaines anémies hémolytiques sévères, le pourcentage d'activité circulant dans les globules rouges monte très rapidement puis, dès le 7ème jour - 8ème jour commence à s'infléchir; ceci est dû à une hémolyse précoce; dans ces cas le réel maximum qui aurait dû être atteint est difficile à déterminer; il paraît nécessaire de prolonger la partie initiale de la courbe telle qu'elle est observée avant l'apparition des stigmates d'hémolyse, et de déterminer ainsi un chiffre d'incorporation fictif. Des courbes typiques de tels faits sont représentées sur la figure 9.

Deux données peuvent encore être tirées de la courbe d'incorporation. La vitesse de l'incorporation, appréciée en mesurant le temps nécessaire pour atteindre la moitié du maximum; elle dépend de la vitesse de maturation cellulaire (qui varierait d'ailleurs peu en pathologie - 140 -) et du volume des compartiments non érythrocytaires interposés entre le fer du plasma et le fer des hématies. La forme de la courbe peut aussi renseigner pour l'étude d'un modèle métabolique : sinusoïde simple si un seul pool s'interpose entre le plasma et hématies, plus complexe si plusieurs pools retardent l'utilisation du fer.

5) Mesure de l'activité au niveau des organes

Chez le rat l'activité des organes est facilement mesurée en tuant l'animal, en prélevant l'organe et en comptant un aliquot. En cristallisant l'hème et en comptant son activité, sachant l'activité du sang circulant au même moment, on peut mesurer la radioactivité circulante dans l'organe, et la soustraire de l'activité totale pour obtenir l'activité réellement fixée à cet organe.

Chez l'homme la mesure de l'activité au niveau des organes utilise des sondes à scintillation à cristal plein dont le cône de détection est approximativement centré sur l'organe à explorer.

Une appréciation des mouvements de fer à partir du plasma vers les divers organes peut être obtenue dans les deux premières heures par enregistrement simultané de l'activité du foie, de la rate et d'un os (sacrum) et de la radioactivité de l'aire précordiale; l'activité mesurée au niveau du foie, de la rate et de l'os doit être corrigée pour la variation de l'activité circulante; celle-ci est considérée être égale à l'activité initiale mesurée au niveau de l'organe, multipliée par le pourcentage circulant de l'activité injectée (connue à tout moment à partir de la courbe de la radioactivité plasmatique).

L'évolution de l'activité pendant les 14 jours de l'épreuve peut être grossièrement calculée de la même façon, à partir de l'activité brute mesurée au niveau des organes en connaissant le pourcentage circulant de la radioactivité injectée. Il semble cependant que les courbes obtenues par cette méthode sont dans une certaine mesure inexactes, par sur-correction. En effet, au niveau du foie et de la rate, on compte sans aucun doute une certaine radioactivité liée à des os, notamment aux vertèbres, dont le corps est riche en moelle rouge. Cette méthode de calcul est cependant plus exacte que celle (120) qui mesure simplement le rapport de l'activité d'un organe à son activité au temps initial; en effet ce procédé ne tient pas compte de l'évolution de l'activité circulante. Les courbes obtenues par ce dernier procédé, rapides à dresser, sont utilisables pour l'interprétation des faits pathologiques mais ne peuvent servir au but que nous nous sommes assigné ici, étudier l'existence et la localisation de compartiments métaboliques non héminiques du fer.

6) Etude simultanée de la durée de vie des hématies

Dans tous les cas, nous avons mesuré la durée de vie des hématies marquées au radio-chrome dans le même temps que la cinétique du radio-fer. Les deux isotopes étaient discriminés par leur énergie gamma différente. La durée de vie des hématies marquées servait de contrôle des données quantitatives sur l'érythropoïèse déduites des calculs de la cinétique du radio-fer.

Chapitre 2

MISE EN EVIDENCE, DANS LES CONDITIONS NORMALES, D'UN COMPARTIMENT METABOLIQUE DU FER ECHANGEABLE AVEC LE PLASMA

Dans les schémas classiques du métabolisme du fer l'ion fer quitte le plasma à un taux constant pour être utilisé à l'érythropoïèse et - dans une moindre mesure - à la mise en réserve. Cette réserve est conçue comme non labile à l'échelle des quinze jours de l'épreuve. De même le fer ayant pénétré dans l'hémoglobine n'est pas échangeable avec le plasma sans destruction préalable de la cellule qui contient l'hémoglobine. La molécule d'hème ne se renouvelle pas pendant toute la vie de la cellule (144); les diverses hémoglobines se marquent de façon homogène (123) et les altérations biochimiques dues au vieillissement ne portent que sur la partie globinique et non sur la partie héminique qui contient le fer (130). Dans ces conditions le schéma métabolique est le suivant :

$$Q1 \longrightarrow Q2 + Q3$$

où Q1, stable, est le compartiment plasmatique
Q2, stable, est le compartiment hémoglobinique
Q3, stable, est le compartiment des réserves.

La répartition entre Q2 et Q3 du flux de fer qui quitte Q1 est indiquée par le taux d'incorporation globulaire du fer au 15ème jour.

Ce schéma métabolique classique simple (66) se traduit mathématiquement par une décroissance exponentielle régulière de l'isotope introduit comme traceur dans Q1. La variation d'activité spécifique dans Q1 est de la forme :

$$a(t) = a(o).e^{-\lambda t}$$

Très rapidement cependant divers auteurs et nous-même (106, 119, 134) ont noté que ce schéma métabolique n'était pas satisfaisant pour les raisons suivantes :

a) le taux de production médullaire calculé à partir du renouvellement plasmatique du fer est supérieur à celui néces-

sité par le renouvellement quotidien des hématies, celui-ci étant déterminé directement par le marquage au radiochrome.

b) les courbes prolongées au-delà de la sixième heure montrent systématiquement une inflexion, indiquant que le renouvellement plasmatique ne se fait pas selon une exponentielle simple.

1) Caractères des courbes de renouvellement plasmatique du fer dans les conditions normales

L'analyse des courbes de décroissance d'activité plasmatique a été menée à partir des faits observés chez l'homme plus qu'à partir de ceux observés chez l'animal. Il est en effet beaucoup plus facile chez l'homme que chez l'animal de prélever de façon répétée des quantités de plasma assez faibles pour ne pas perturber la masse plasmatique; en outre certaines affections spontanées humaines constituent des états métaboliques plus typiques et stables qu'aucun de ceux réalisables expérimentalement. Cependant, dans tous les cas où cela a été possible, on a contrôlé expérimentalement chez l'animal que les faits cinétiques avaient un caractère général.

Les mathématiciens (135) admettent qu'à partir d'une courbe expérimentale on ne peut séparer plusieurs exponentielles que si le pourcentage et leur pente varient dans une proportion de 1 à 10. On a souligné aussi (145) le risque considérable qu'implique l'usage du papier semi-logarithmique où les points s'alignent avec une remarquable et trompeuse facilité. Ces réserves faites, on doit admettre qu'on observe de façon constante chez l'homme et l'animal normaux deux courbes exponentielles (tableau 33).

Certains croient cependant pouvoir mettre en évidence dans le renouvellement plasmatique normal du fer un système de triple exponentielle. Pour l'un de ces auteurs (120), cette composante de la courbe, qui selon lui signifierait l'existence d'un mouvement vers les réserves, est assez faible dans l'état normal pour être négligé. Au contraire d'autres (176) résolvent toutes leurs courbes expérimentales selon un système de triple exponentielle, considérant que la seconde courbe correspond à l'équilibre du pool plasmatique du fer avec un pool extra-circulant à renouvellement rapide; les deux courbes qu'ils dégagent de ce que nous ne considérons que comme une seule

droite sont en fait très proches l'une de l'autre et une large indétermination existe dans leur calcul du pourcentage de la pente de ces courbes (176-IV). Nous considérerons, avec d'autres (34, 106 bis, 120), que la disparition plasmatique du radio-fer dans les conditions physiologiques se fait selon un système simple de deux courbes exponentielles. Habituellement la première courbe représente 99 % du renouvellement total du fer et sa période est de l'ordre de 100 minutes; la deuxième représente 1 % du renouvellement du fer et sa période est de l'ordre de 3 jours. Chez le rat, la seconde courbe est plus importante en pourcentage et sa pente est plus grande que chez l'homme .

2) Interprétation des courbes de renouvellement plasmatique du fer dans les conditions normales (courbes à double exponentielle).

Trois hypothèses peuvent être soulevées pour expliquer cette image.

a) Il est théoriquement possible que ce système de courbes représente l'équilibre de la transferrine marquée entre le pool circulant et un pool extra-circulant (175); le rapport (1 à 100 chez l'homme normal) entre le point d'extrapolation au temps zéro de la seconde courbe et le point indiquant l'activité totale d'un ml de plasma à ce temps indiquerait le rapport du volume circulant au volume total; la pente de la seconde courbe indiquerait le renouvellement réel du fer protéique qui s'appliquerait au volume total ainsi déterminé.

Cette hypothèse ne peut être soutenue, même en sachant que le taux de la sidérophiline des espaces extra-cellulaires est faible, pour expliquer l'existence des deux courbes constatées. D'ailleurs l'équilibre est rapide entre l'activité du plasma, celle de la lymphe du foie (117) et du canal thoracique (117, 176), et celle du liquide d'ascite et du liquide pleural supposés représentés l'espace extra-cellulaire (176 - I -). Cette équilibration plasma-lymphe et plasma-liquides extra-cellulaires pourrait au contraire rendre compte de l'excès signalé plus haut du volume "plasmatique" calculé par dilution de la sidérophiline marquée; elle expliquerait l'aspect des courbes d'activité circulante montrant une chute nette de cette activité dans les premières minutes après l'injection de fer (Fig. 7).

b) On peut supposer que la seconde courbe exponentielle est due à la remise en circulation de fer en provenance d'érythroblastes détruits précocement, dans la moelle, par "l'érythropoïèse inefficace" (83, 90). Divers arguments permettent d'éliminer ce modèle métabolique.

Dans un tel cas, on n'obtiendrait pas une exponentielle vraie, mais une sorte de "dôme" d'activité vers le 2ème - 3ème jour. C'est d'ailleurs ce que l'on observe souvent, de façon nette, dans des troubles de maturation érythroblastique (Fig. 9). D'autre part, dans les cas normaux, cette érythropoïèse inefficace est un phénomène quantitativement très faible (90, 162bis).

Dans les hyposidérémies, la seconde se dégage très tôt et est très rapide; on peut observer dès la première heure que l'exponentielle apparente initiale n'est pas unique et que les points expérimentaux se décalent vers le haut (tableau 33). Il faudrait donc admettre, ce qu'aucun fait ne permet de soutenir, que l'hémolyse intra-médullaire est très précoce et extrêmement importante dans un tel cas.

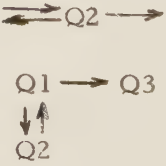
Dans les érythroblastopénies également, la seconde courbe exponentielle se dégage très tôt; comme il n'y a ici aucun érythroblaste, ce ne peut être une hémolyse intra-médullaire qui explique la courbe observée.

Enfin, si ce schéma était exact, il n'expliquerait pas la présence d'activité constatée chez l'animal dans des compartiments non héminiques de la moelle, du foie et de la rate après injection intra-veineuse de radio-fer.

c) Ainsi l'existence d'une courbe complexe de décroissance plasmatique du radio-fer implique une réalimentation du plasma à partir de fer qui l'avait quittée préalable mais n'avait pas encore gagné le compartiment définitif, héminique. Pour une courbe exponentielle double, deux types de modèles peuvent être proposés (104, 120), le modèle mamillaire et le modèle caténaire :

° modèle caténaire = $Q1 \rightleftharpoons Q2 \longrightarrow Q3$

° modèle mamillaire =



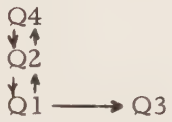
où Q1 est le pool plasmatique

Q2 un pool non héminique échangeable avec le plasma

Q3 le pool héminique stable.

Le mode général de résolution du problème est indiqué pour ces deux schémas, compliqué par la nécessité d'y introduire un mouvement vers les réserves Q4, puisque dans les conditions normales l'incorporation globulaire du fer n'est que de 75 - 90 % de la quantité injectée. Dans les deux résolutions présentées, on a supposé le mouvement Q4 $\rightleftarrows$ Q1 (schéma caténaire) et Q4 $\rightleftarrows$ Q2 $\rightleftarrows$ Q1 (schéma mamillaire) trop faible pour intervenir dans les calculs portant sur une épreuve de 14 jours seulement.

Note 1 : Résolution du schéma mamillaire



Les valeurs à déterminer sont les flux d'échange de Q1 à Q3 (α 13), de Q1 à Q2 (α 12), de Q2 à Q4 (α 24) et de Q2 à Q1 (α 21).

L'équation différentielle du système est :

$$\frac{dx1}{dt} = -(\alpha 12 + \alpha 13)\,x1 + (\alpha 21\, x2)$$

$$\frac{dx2}{dt} = (\alpha 12\, x1) - (\alpha 21 + \alpha 24)\,x2$$

$$\frac{dx3}{dt} = (\alpha 13\, x1)$$

$$\frac{dx4}{dt} = (\alpha 24\, x2),$$ la rééquilibration à partir de Q4 étant considérée comme quantitativement négligeable dans le cas du sujet normal.

La transformation de CARSON-LAPLACE de ce système aboutit au système d'équations algébriques suivant au temps initial :

$$\begin{array}{llll}
(S + \alpha 12 + \alpha 13)\,x1 - (\alpha 21 x2) & 0 & 0 & = 1 \\
(-\alpha 12\, x1) + (S + \alpha 21 + \alpha 24)x2 & 0 & 0 & = 0 \\
(-\alpha 13\, x1) \qquad 0 & + (S\, x3) & 0 & = 0 \\
0 \qquad (-\alpha 24\, x2) & 0 & (S\, x4) & = 0
\end{array}$$

On peut calculer la transformée X 1 par la méthode des déterminants

$$X/1 = \frac{\Delta X}{\Delta}$$

$$\Delta = \begin{vmatrix} (S + \alpha 12 + \alpha 13) & (-\alpha 21) \\ (-\alpha 12) & (S + \alpha 21 + \alpha 24) \end{vmatrix} \times \begin{vmatrix} S & 0 \\ 0 & S \end{vmatrix}$$

$$= (S + \alpha 12 + \alpha 13)\ (S + \alpha 21 + \alpha 24) - (\alpha 12\ \alpha 21)\ (S^2)$$

$$\Delta X = (S + \alpha 21 + \alpha 24)\ (S^2)$$

On en tire

$$XI = \frac{\Delta X}{\Delta} = \frac{(S + \alpha 12 + \alpha 24)}{(S + \alpha 12 + \alpha 13)\ (S + \alpha 21 + \alpha 24) - (\alpha 12\ \alpha 21)} \qquad (1)$$

Le quotient d'un polynôme du premier degré par un polynôme du second degré est la transformée XI d'une équation du type $xL = A.e^{-1t} + B.e^{-1_2 t}$

La variation de xl en fonction du temps se fait donc bien par un système de deux exponentielles.

La transformée Xl d'un tel système $= \frac{A}{S + \lambda 1} + \frac{B}{S + \lambda 2}$

$$= \frac{A\ (S + \lambda 2) + B\ (S + \lambda 1)}{(S + \lambda 1)\ \ (S + \lambda 2)} \qquad (2)$$

Si on compare cette équation (2) à l'équation (1) et si l'on développe l'une et l'autre on tire aisément, des valeurs de A, B, 1 et 2 (c'est-à-dire le pourcentage et le taux de renouvellement de chacune des deux courbes exponentielles expérimentales 1 et 2) les valeurs suivantes pour les flux $\alpha 12, \alpha 13, \alpha 21$ et $\alpha 24$:

(3) $A + B = 1$
(4) $A\lambda 2 + B\lambda 1 = \alpha 21 + \alpha 24$
(5) $\lambda 1 + \lambda 2 = \alpha 12 + \alpha 13 + \alpha 21 \alpha + 24$
(6) $\lambda 1.\lambda 2 = (\alpha 12 + \alpha 13)(\alpha 21 + \alpha 24) - (\alpha 12\ \alpha 21)$

A ce système d'équation il faut ajouter la valeur de F (incorporation maximum du fer dans l'hémoglobine), qui est égale au flux allant à l'hème, rapporté à la totalité du flux quittant Q1 définitivement :

$$(7)\quad F = \frac{\alpha_{13}}{\alpha_{13} + \alpha_{12}\,\frac{(\alpha_{24})}{(\alpha_{21} + \alpha_{24})}}$$

Les équations (4) à (7) constituent un système de quatre équations à 4 inconnues et l'on peut ainsi calculer aisément les valeurs des flux :

$$\alpha_{13} = \frac{F\,(\lambda_1\,\lambda_2)}{A\lambda_2 + B\lambda_1}$$

$$\alpha_{12} = (\lambda_1 + \lambda_2) - (A\lambda_2 + B\lambda_1) - \alpha_{13}$$

$$\alpha_{21} = \frac{(\lambda_1 + \lambda_2)\,(A\lambda_2 + B\lambda_1) - (\lambda_1\,\lambda_2) - (A\lambda_2 + B\lambda_1)^2}{\alpha_{12}}$$

$$\alpha_{24} = (A\lambda_2 + B\lambda_1) - \alpha_{21}$$

Note 2 : Utilisation d'un modèle caténaire $Q4 \rightarrow Q1 \rightleftarrows Q2 \leftarrow Q3$

Le même calcul que précédemment est fait à partir du système d'équations différentielles

$$\frac{dx1}{dt} = -(\alpha_{12} + \alpha_{14})\,x_1 + \alpha_{21}\,x_2$$

$$\frac{dx2}{dt} = -(\alpha_{21} + \alpha_{23})\,x_2 + \alpha_{12}\,x_1$$

$$\frac{dx3}{dt} = \alpha_{23}\,x_2$$

$$\frac{dx4}{dt} = \alpha_{14}\,x_1$$

Sa résolution aboutit aux équations :

$$\alpha_{14} = (1-f)\,\frac{\lambda_1\,\lambda_2}{A\lambda_2 + B\lambda_1}$$

$$\alpha_{12} = (\lambda_1 + \lambda_2) - (A\lambda_2 + B\lambda_1) - \alpha_{14}$$

$$\alpha_{23} = \frac{(\lambda_1\lambda_2)f}{\alpha_{12}}$$

$$\alpha_{21} = (A\lambda_2 + B\lambda_1) - \alpha_{23}$$

Ces systèmes de résolution permettent d'obtenir des valeurs numériques pour les flux joignant un compartiment à un autre. On connait d'autre part la valeur pondérale de Q1 égale au taux du fer plasmatique (déterminé chimiquement) multiplié par le volume plasmatique. Le système étant présumé en équilibre, on peut en déduire le volume des compartiments intermédiaires et les flux,en poids de fer par unité de temps, joignant les uns aux autres.

Ces deux modèles ne sont qu'une partie des 16 modèles métaboliques discutés par Sharney et coll. (176). Quatre espèces différentes (tableau 23) se séparent par les possibilités suivantes : le fer pour l'érythropoïèse et le stockage vient de Q1 (plasma) ; il vient de Q2 (pool labile extra-circulant) ; le fer pour l'érythropoïèse vient de Q1 et celui pour les réserves vient de Q2 et vice-versa. Chacun de ces modèles peut être lui-même subdivisé en 4 fractions selon le lieu d'entrée du traceur : dans le pool Q1, dans le pool Q2. en partie dans Q1 et dans Q2 (et dans ce cas U = fraction de fer destiné à l'hème

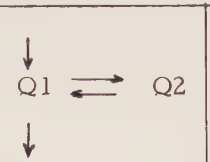
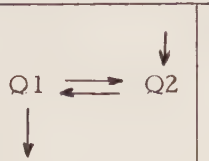
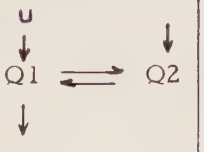
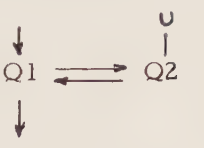
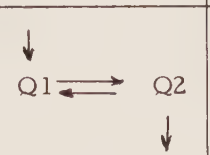
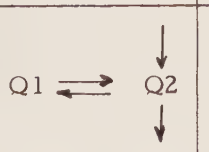
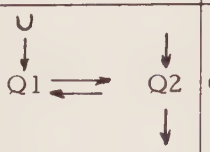
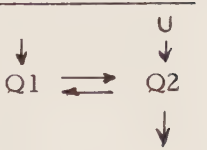
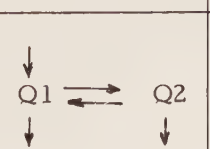
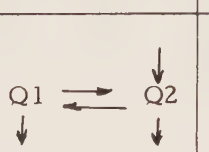
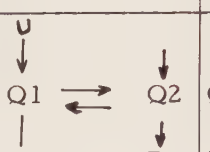
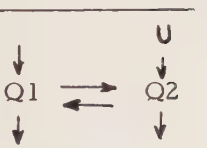
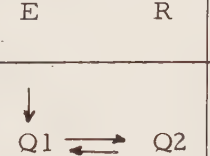
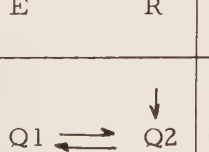
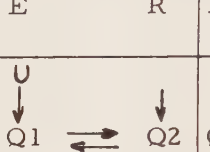
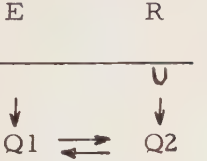
$$= \frac{\text{fer utilisé pour l'hème}}{\text{fer entrant dans le système}}$$

est fourni à Q1 et 1 - U à Q2

et vice-versa). On obtient ainsi six schémas (176 II) dont très peu sont raisonnables. Dans l'exploration in vivo seuls les schémas où le fer est fourni au plasma peuvent être retenus puisque le fer est injecté intra-veineux. On ne peut donc retenir que les modèles de la colonne a. Chez le sujet normal où le mouvement vers les réserves est faible, les modèles I a et III a correspondent à notre modèle mamillaire, les modèles II a et IV a au modèle caténaire soutenu par Pollycove (120).
Nous nous limiterons donc ici à la discussion de la validité respective des deux systèmes les plus simples et les plus acceptables, qui sont dans ce tableau Ia et IIa.

Tableau 25

SCHEMAS METABOLIQUES UTILISABLES POUR UN SEUL COMPARTIMENT NON HEMINIQUE DU FER (selon Sharney et coll. 176 II)

Mode de sortie du fer	a entrée du fer dans le plasma	b entrée du fer dans le pool labile extra-circulant	c U(ferpour hème / fer total) entre dans Q1 et (1-U) dans Q2	d U entre dans Q2 et (1-U) dans Q1
I Sortie à travers le pool Q1				
II Sortie à travers le pool Q2				
III Sortie de Q1 pour l'érythropoïèse, de Q2 pour les réserves				
IV Sortie de Q1 pour les réserves de Q1 pour l'érythropoïèse				

mode d'entrée du fer

3) Choix du modèle

Les deux modèles, caténaire et mamillaire, ne sont pas égaux du point de vue biologique. Partant les mêmes données expérimentales, l'exploitation mathématique des modèles aboutit à des différences sensibles dans les flux quotidiens et dans le colume du compartiment d'équilibre. Un exemple est donné ci-dessous, chez un sujet normal :

première courbe exponentielle : 99,3 % $\lambda 1 = 9,1$

deuxième courbe exponentielle : 0,7 % $\lambda 2 = 0,17$

incorporation globulaire : 90 %

compartiment plasmatique : 1,98 mg

modèle caténaire	modèle mamillaire
$\alpha 12 = 8;372$	$\alpha 12 = 3,052$
$\alpha 23 = 0,166$	$\alpha 13 = 5,985$
$\alpha 21 = 0,066$	$\alpha 21 = 0,183$
	$\alpha 24 = 0,050$
Q2 = 71,45 mg	Q2 = 50,8 mg
mouvement vers l'hème = 11,85 mg/j	mouvement vers l'hème = 11,85 mg/j

Le modèle caténaire est caractérisé par la taille du compartiment d'échange plus grande que celle prévue par le système mamillaire, par la localisation obligatoire de celui-ci dans l'organe érythropoïètique (obligatoire puisque le fer est fourni à l'érythroblaste directement à partir de ce compartiment) par la lenteur avec laquelle le fer entre dans le compartiment terminal (puisque tout le fer traverse un compartiment intermédiaire de grand volume). Ce sont des différences dans la cinétique du fer, selon qu'on choisit l'un ou l'autre modèle, qui ont été exploitées pour choisir celui qui rend le mieux compte des faits observés.

a) Calcul du flux quotidien de fer vers l'hème

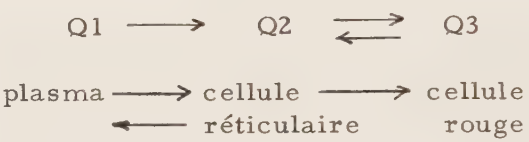
Des moyens indirects, mais sûrs, permettent de calculer la quantité exacte d'hémoglobine synthétisée par jour. Si le système est en équilibre, la perte équilibre l'apport, et le calcul de la perte quotidienne permet de mesurer indirectement la synthèse quotidienne d'hémoglobine. Le calcul de cette perte peut être chiffré avec précision par les méthodes de marquage isotopique au C 14, au Cr 51 et au DFP 32.

Chez le sujet, normal ou non, la production calculée selon les deux modèles, caténaire et mamillaire, est rigoureusement la même. La concordance entre les chiffres de renouvellement globulaire déduits des mouvements du fer et les chiffres obtenus par l'étude de la durée de vie des érythrocytes marqués ne peut donc pas être un argument pour l'un ou pour l'autre des modèles, comme certains l'avaient pensé (120).

b) Absence d'échange direct de fer entre la cellule rouge et le plasma

Le modèle caténaire implique que la cellule réceptrice, en l'espèce la cellule rouge, soit susceptible d'échanger son fer avec le plasma si on admet (120) la localisation de Q2 dans la cellule érythropoëtique. La vérification peut être apportée in vitro en faisant incuber en plasma frais des réticulocytes marqués in vitro ou in vivo. Certains auteurs ont trouvé dans de telles expériences un échange élevé (118) ou modeste (101) de fer gagnant effectivement le plasma. Pour notre part, comme ceci est développé dans la première partie de ce travail, nous n'avons trouvé aucun échange significatif de fer de la cellule vers le plasma : la seule perte observée nous paraît être celle de fer fixé de façon non spécifique à des hématies âgées. En particulier il n'y a aucune perte de fer, à destination du plasma, à partir de cellules marquées in vivo. Ceci est en accord avec les observations d'autres auteurs (2, 107). D'autre part, si on étudie dans le temps l'échange de fer entre culot cellulaire et plasma, on note qu'il est très rapide, s'il existe (101, 118), ce qui est un argument très fort contre son caractère physiologique, puisque dans le schéma métabolique caténaire Q2 est volumineux et α 21 est de taux bas.

Ces arguments prouvent que Q2 n'est pas dans les cellules rouges circulantes; mais certains pensent que ce qui est faux pour le réticulocyte circulant est peut-être vrai pour l'érythroblaste de la moelle, impossible à isoler pour réaliser une expérimentation in vitro (14, 117). Le schéma caténaire peut encore être soutenu si l'on admet que Q2 est dans les cellules réticulaires de la moelle et que se superpose un système de compartiments et une localisation cellulaire (51), selon le schéma suivant :



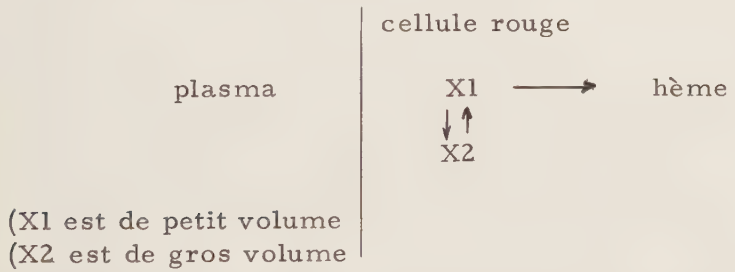
Or on sait que des arguments cytologiques ont permis de montrer l'existence de fer dans les cellules réticulaires de la moelle, et un échange de ferritine entre cette cellule et l'érythroblaste (15).

On ne peut pas affirmer l'inexistence d'une telle voie indirecte de transfert du fer. Mais plusieurs arguments plaident contre l'existence d'une telle voie physiologique, du moins contre son importance quantitative. Les observations cytologiques, non dynamiques, n'ont pas de valeur quantitative; au contraire le transfert du fer par cette voie paraît d'après ces observations modeste dans des anémies hypochromes (16) où l'on sait que l'utilisation du fer est rapide et élevée. In vivo, du fer s'incorpore directement, à partir du plasma, dans les réticulocytes circulants. Le réticulocyte isolé est capable de synthètiser sa propre apoferritine, en fonction de ses besoins, sans qu'il doive recourir à la fourniture d'une protéine préformée en dehors de lui (167). L'auto-radiographie de frottis de moelle après injection de fer à l'animal met en évidence un marquage immédiat des érythroblastes (6). Enfin, in vitro, le taux de synthèse d'hème en une heure à partir du plasma dans des réticulocytes jeunes est le même que celui calculé à partir des expériences faites in vivo (104 - II). Ces faits indiquent que la voie directe plasma → cellule rouge est probablement la voie physiologique essentielle.

c) Vitesse de synthèse de l'hémoglobine dans les cellules rouges

L'étude de la vitesse de synthèse de l'hème, in vivo, dans le sang et dans la moelle, apporte un argument pour le choix du modèle. Dans le modèle caténaire, l'existence d'un volumineux compartiment interposé entre Q1 (plasma) et Q3 (hème) implique que l'apparition de fer dans l'hème est lente et progressive si, comme le pense POLLYCOVE (120), ce compartiment labile est érythroblastique. Dans le modèle mamillaire, le pourcentage du fer érythrocytaire présent dans Q3 (hème) doit d'être d'emblée de 100 % puisqu'il n'y a pas de compartiment directement interposé entre plasma et hème.

En fait Q3 ne représente pas forcément seulement l'hème, mais l'ensemble des compartiments terminaux qui n'ont pas d'échange en retour avec le plasma. Dans la cellule rouge in vitro, les expériences développées dans la première partie de ce travail montrent l'existence des compartiments non héminiques, non échangeables avec le milieu extérieur disposés selon un système de type mamillaire, impliquant une progression de l'activité héminique rapide puis lente :



Dans ces conditions la cinétique d'incorporation du fer dans l'hème in vivo doit être comparée à celle observée in vitro.

Les tableaux 25 et 26 montrent qu'aucun compartiment de grand volume échangeable avec le plasma n'est interposé, dans le réticulocyte, entre plasma et hème. En effet la vitesse d'incorporation globulaire du fer fixé in vivo dans l'hème est très rapide; la courbe d'incorporation héminique est la même après marquage in vivo, et après marquage in vitro, condition où on a démontré que ne s'interpose aucun compartiment échangeable avec le plasma; enfin l'incubation en plasma froid montre qu'aucune radioactivité ne quitte le réticulocyte après marquage in

vivo. Ces arguments amènent à nier l'existence d'un pool échangeable entre Q1 et Q3 dans le réticulocyte, ou tout au plus à le considérer négligeable (117, discussion).

Les faits observés dans la moelle sont d'interprétation plus difficile. En effet il y a dans la moelle d'autres cellules que les érythroblastes, capables de fixer du fer et pouvant participer au pool échangeable Q2. D'autre part, in vivo, les érythroblastes marqués vont quitter la moelle et, si le renouvellement d'un compartiment non héminique extra-érythroblastique est plus lent que la vitesse de sortie des érythroblastes, le pourcentage de l'activité totale retrouvée sous forme héminique aura tendance à baisser, ce qui peut être le cas dans certains conditions expérimentales (Tableau 24). Pour ces raisons, chez l'animal normal, on a admis que l'activité non héminique observée à la 24ème heure représentait une activité non érythroblastique : son taux est d'à peu près 30 % de l'activité totale. On a donc soustrait ce pourcentage de l'activité mesurée dans la moelle entière du fémur aux différents temps de sacrifice dans les 5 premières heures. On a exprimé l'activité héminique en pourcentage de l'activité érythroblastique ainsi déterminée, sans se dissimuler cependant le caractère approximatif d'un tel calcul.

Dans le tableau 25 on a indiqué l'activité héminique érythroblastique, celle qu'on devrait trouver si le schéma mamillaire était exact (compte tenu de l'existence de petits compartiments intra-cellulaires non échangeables dans l'érythroblaste, tels que les mesure l'étude faite in vitro), et celle qu'on devrait trouver si le schéma caténaire avec présence de Q2 dans l'érythroblaste était exact.

Tableau 24

EVOLUTION DE L'ACTIVITE NON HEMINIQUE MEDULLAIRE
(son augmentation tardive indique que la perte de fer appartenant au compartiment non héminique est plus lente que celle du fer héminique sortant avec les érythroblastes)

Pourcentage de l'activité non héminique dans la moelle totale du rat après injection intra-cardiaque de radio-fer	après 1 h	2 h	4 h	6 h	11 h	24 h	48 h	72 h	114 h
	42 %	36 %	32 %	31 %	30 %	30 %	36 %	39 %	44 %

Tableau 25

ACTIVITE HEMINIQUE ERYTHROBLASTIQUE REELLE ET ACTIVITE THEORIQUEMENT OBSERVEE SELON LES SCHEMAS MAMILLAIRE ET CATENAIRE
(Pool labile érythropoïètique). Les chiffres donnés sont la moyenne de 5 expériences faites sur des lots de 12 à 15 rats normaux

Activité héminique exprimée en pourcentage de l'activité totale médullaire après correction (voir texte)	après 1/2 h	1 h	1 h 30	2 h 15	3 h	3 h 45	4 h 30
	73 %	82 %	88 %	90 %	92 %	96 %	98 %
Activité héminique théoriquement observée en cas de mouvement du fer selon le modèle mamillaire (après correction pour les pools non échangeables intra-cellulaires)	50 %	71 %	74 %	79 %	83 %	87 %	90 %
Activité héminique théoriquement observée en cas de mouvement de fer selon le système caténaire (caractéristiques dans le texte)	0,95 %	2 %	3,1 %	4,8 %	6,8 %	8,9 %	11,1 %

Tableau 26

CINETIQUE DE LA SYNTHESE DE L'HEME IN VIVO DANS LES HEMATIES CIRCULANTES DE RAT NORMAL

	après 1/2 h	1 h	1 h 30	2 h 15	3 h	3 h 45	4 h 30
Activité présente sous forme héminique dans les érythrocytes circulants (en % de l'activité totale)	48 %	66 %	74 %	81 %	80 %	88 %	92 %
Activité présente sous forme héminique dans les érythrocytes après incubation de 10 minutes en plasma marqué, suivie de lavage et de remise en suspension en plasma frais (en % de l'activité totale)	45 %	68 %	72 %	83 %	-	91 %	

Tableau 27

CINETIQUE DE LA SYNTHESE DE L'HEME, IN VIVO, CHEZ L'HOMME NORMAL

Activité présente sous forme héminique dans les érythrocytes circulants (en % de l'activité totale)	après 4 h	après 24 h	après 48 h
cas 1	49 %	80 %	82 %
cas 2	84 %	94 %	98 %
cas 3	82 %	89 %	93 %

Les constatations faites s'accordent avec le schéma mamillaire à condition d'admettre l'existence intra-cellulaire de compartiments non héminiques non échangeables de petit volume, tels qu'ils sont calculés par les expériences faites in vitro. Elles sont parfaitement contradictoires avec le schéma caténaire où, compte tenu du gros volume de Q2, la pénétration dans l'hème devrait être lente et régulièrement progressive.

d) Fixation de fer, à partir du plasma, dans des organes non érythropoïètiques et échange de ce fer avec le plasma

Dans les cas où le système est simple, avec deux courbes expérimentales de décroissance plasmatique du fer et une incorporation globulaire proche de 100 %, le système caténaire implique qu'aucune fixation de fer ne se fait ailleurs que dans le système érythropoïètique.

Les observations faites chez l'homme, au contraire, indiquent qu'une partie du fer se fixe d'emblée dans le foie et, plus modérément, dans la rate et quitte ces organes au cours des 15 jours de l'épreuve. Malheureusement ces mesures ne peuvent être quantitatives compte tenu de ce qu'on ignore la proportion exacte de l'organe (foie, rate, moelle) contenue dans le cône de détection du scintillateur. On observe cependant deux faits. La courbe d'activité des aires hépatique et splénique enregistrée pendant les deux premières heures de l'épreuve montre une fixation de fer ; elle peut être mesurée en fonction du temps, sachant l'activité initiale (activité exclusivement circulante) et la décroissance de l'activité plasmatique; cette courbe est curvilinéaire et coïncide avec une courbe théorique de fixation de fer à un taux constant à partir d'un pool d'activité décroissante comme le plasma. Elle se décale en fait un peu vers le bas par comparaison avec la courbe théorique, ce qui peut être expliqué par la fuite vers le plasma d'une partie du fer ayant préalablement gagné l'organe. D'autre part l'analyse des courbes d'activité de ces deux aires entre le 2ème et le 10ème jour montre une fuite du fer à une vitesse analogue à celle de la fuite du fer hors du plasma à ce moment (courbe tardive); celà implique que ces deux régions, hépatique et splénique, participent à la constitution du pool échangeable Q2 qui conditionne l'existence même de la courbe lente de renouvellement de la radioactivité plasmatique.

Les observations faites chez le rat ont complété les précédentes. Les rats ont été sacrifiés à intervalles déterminés après l'injection intra-cardiaque du radio-fer et la radioactivité totale non héminique était mesurée dans le foie, la rate, l'intestin grêle, le poumon, le muscle, le rein, un fémur. On admettait (84) qu'un fémur de rat contient environ 8 % de la moelle totale de l'animal, ce que paraît confirmer l'utilisation de la caméra à scintillation après injection de Fe 52 émetteur de positrons.

On avait l'espoir de pouvoir définir la localisation du compartiment Q2 et de vérifier que son volume et son taux de renouvellement seraient semblables aux valeurs déterminées à partir de la courbe de décroissance plasmatique. Les chiffres indiqués sur le tableau 28 A constituent la moyenne de trois séries d'expériences.

Des faits observés, on peut déduire les constatations suivantes. L'activité non héminique des divers organes progresse rapidement et atteint son maximum à la 5ème - 6ème heure. L'activité cumulée du muscle, du rein, des poumons et de la peau est très faible, n'atteignant pas au maximum une valeur de 1 % de l'activité totale non héminique de l'organisme. L'interprétation des faits observés dans l'intestin, le foie, la rate et la moelle nécessite pour chacune de ces localisations un commentaire particulier.

L'activité fixée à l'intestin grêle est élevée, comme ceci a déjà été observé (146). Elle a le caractère particulier d'être régulièrement répartie le long du tube digestif (105 - 146), alors que la fixation d'activité après ingestion est électivement duodénale (31). On a d'autre part montré que du fer pouvait être excrété dans le tube digestif, à un taux d'ailleurs moins élevé (en pourcentage du fer circulant dans le plasma) chez l'homme que chez le rat (21-37-42-146-169). Chez cet animal notre expérimentation a montré que les deux tiers de l'activité fixée à la paroi intestinale sont perdus dans les selles, et qu'un tiers regagne le plasma (tableau 28 B); ce retour au plasma se ferait, soit directement, soit par réabsorption d'une partie du fer excrété, mais cette dernière est probablement faible puisque l'excrétion se fait dans tout l'intestin et non pas seulement dans l'intestin proximal seul capable de réabsorber du fer. On a donc considéré le tiers de l'activité fixée au maximum à l'intestin comme participant au compartiment Q2 défini mathématiquement par sa possibilité d'échange en retour avec le plasma.

L'activité fixée à la rate atteint à son maximum, vers la 4ème - 5ème heure, environ 5 % de l'activité totale injectée. L'existence d'une métaplasie érythro-myéloïde de la rate, fréquente chez les jeunes rongeurs, était recherchée systématiquement par l'examen histologique, et la cristallisation de l'hème présent dans le broyat de rate permettait de soustraire de l'activité totale ce qui revenait réellement à l'activité non héminique. Le tableau 28 C montre l'importance de cette correction dans le cas d'une anémie hémolytique avec érythroblastose splénique, alors que chez l'animal normal la correction tient surtout à l'activité due au sang circulant. Si on tient compte de cette correction, on observe une courbe de décroissance d'activité non héminique splénique (tableau 29), compatible avec les données déduites du calcul pour l'échange entre Q2 et plasma; la pente de l'activité splénique réelle en fonction du temps était en effet la même que la pente de l'exponentielle tardive de disparition du fer plasmatique. Dans le cas des aplasies et du saturnisme chronique expérimental, l'activité fixée à la rate reste presque totalement stable; une partie faible seulement de l'activité fixée participe à l'échange Q2 $\rightarrow$ plasma, le reste étant réellement mis en réserve.

L'interprétation des courbes d'activité non héminique du foie est plus délicate parce que plusieurs compartiments en font partie : compartiment vasculaire, compartiment Q2 d'échange avec le plasma, compartiment des réserves labiles (Q4) à renouvellement lent et qui existe dans tous les cas sauf peut-être les grandes hyposidérémies, compartiment des réserves fixes enfin (Q5) qui ne se manifeste pas sur les courbes plasmatiques et s'équilibre avec les réserves labiles à un taux très lent de l'ordre d'un à deux ans chez l'homme normal. Dans quatre séries différentes de rats normaux, l'activité non héminique du foie, pratiquement stable du 3ème au 7ème jour, était en moyenne de 9,5 % de l'activité totale injectée, et on peut considérer qu'il s'agit du fer mis en réserve. Entre la 5ème et la 50ème heure on constate chez tous ces animaux une baisse d'activité non héminique, qui peut être considérée comme la mobilisation vers le plasma, à vitesse assez grande, d'une quantité de fer représentant 2 à 4 % du fer total injecté. La vitesse de disparition de cette activité est du même ordre que la vitesse de renouvellement (α 21) du pool labile Q2 du modèle mamillaire.

Tableau 28

VARIATION D'ACTIVITE DE DIVERS ORGANES
EN FONCTION DU TEMPS

Activité mesurée en % de l'activité totale injectée	2 h 30	4 h 30	6 h	9 h
foie	85	145	160	140
rate	34	45,2	50,5	47,8
muscle (une cuisse)	0,2	0,7	0,8	0,4
intestin grêle	17,8	28,5	42	32,5
reins	3	5,5	7,5	6
poumons	3,8	3,9	4,6	3,9

A. Activité présente dans les divers organes après injection de fer radioactif au rat (activité totale - activité héminique)

	6 heures	18 heures	30 heures
Activité intestinale	6 000 c/p/m	3 200 c/p/m	1 800 c/p/m
Activité cumulée mesurée dans les selles		1 400 c/p/m	1 800 c/p/m
Activité ayant effectivement regagné le plasma (différence entre l'activité initiale et la somme des activités de l'intestin et des excreta)		1 400 c/p/m	2 400 c/p/m

B. Mouvement de l'activité intestinale après injection de fer radioactif au rat

Rats normaux	9 h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h	29 h	48 h
Activité totale	4,7%	4,8%	5,4%	5,3%	5,1%	5,0%	4,3%	3,8%
Activité non héminique	3,65%	3,5%	3,3%	2,7%	2,7%	2,4%	2 %	1,7%

Rats en poussée hémolytique

	6 h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h	29 h
Activité totale	7,7%	8,4%	5,2%	4,6%	5,4%	1,9%	1,5%
Activité non héminique	3,6%	3,6%	3,1%	3,2%	2,2%	1,3%	0,8%

C. Mouvements de l'activité splénique après injection de fer radioactif au rat.

Tableau 29

DISPARITION DE L'ACTIVITE NON HEMINIQUE SPLENIQUE

Rats normaux	Perte de 50% de l'activité non héminique de la rate	Période de la courbe plasmatique tardive
A	30 h	25 h
B	25 h	20 h
C	17 h	15 h
Rats en régénération post-hémolytique		
A	12 h	10 h
B	10 h	10 h

L'interprétation des courbes médullaires pose les mêmes difficultés puisqu'il s'y superposent un compartiment érythroblastique qui lui-même quitte la moelle et un compartiment non érythroblastique, non héminique. Celui-ci, on l'a noté, représente chez le rat normal vers la 10ème heure 20 à 30% de l'activité totale de la moelle. On a indiqué dans le tableau 30 les valeurs de l'activité non héminique de la moelle, en l'exprimant par rapport à l'activité totale reçue par cet animal. Chacun des points correspond à une moyenne des résultats obtenus chez 4 animaux sacrifiés.

Tableau 30

ACTIVITE MEDULLAIRE NON-HEMINIQUE APRES INJECTION DE RADIO FER AU RAT IN VIVO

Temps	5 h	6 h	7 h	16 h	22 h	30 h
Activité totale de la moelle °	40,5	45	48	37,5	30	16
Activité non héminique °	16	15,6	10,8	7,5	3,6	2,4

° Valeurs exprimées en pourcentage de l'activité totale injectée (en admettant que la moelle totale vaut 12,5 fois celle d'un fémur).

Ainsi chez l'homme comme chez l'animal, on a prouvé la fixation de fer à partir du plasma vers des organes non érythropoïètiques (foie, rate, intestin grêle), ainsi qu'une fixation dans un compartiment médullaire non héminique non érythroblastique Ce fer constitue pour partie une réserve, et pour partie s'échange avec le plasma avec une vitesse semblable à celle du pool labile que suggère le schéma mamillaire.

e) Courbe d'activité du fer non-héminique et non-érythroblastique de l'organisme

L'exactitude du schéma mamillaire serait prouvée s'il était possible en toute rigueur de faire se superposer deux courbes : la courbe d'activité spécifique de Q2 déduite par le calcul des exponentielles de renouvellement plasmatique du fer, la courbe

d'activité spécifique d'un compartiment du fer bien précisé. Or ce compartiment n'est pas précisé chimiquement, ni "géographiquement". On a donc considéré dans le tableau 31 comme Q2 la somme des 4 valeurs, toutes approchées :

- l'activité intestinale, moins ce qui va se perdre dans les selles (a);
- l'activité splénique, moins ce qui paraît être une activité circulante ou érythroblastique (b);
- l'activité hépatique, moins ce qui paraît ressortir du pool des réserves (c);
- l'activité médullaire, moins ce qui est érythroblastique (d).

Le calcul de la courbe théorique de Q2 (colonne I, tableau 31) a été fait à partir des valeurs numériques suivantes (moyennes de toutes les valeurs expérimentales observées chez le rat normal) :

courbe 1 : T 50 = 1,1 h pourcentage : 98,3 %

courbe 2 : T 50 = 20 h pourcentage : 1,7 %

incorporation globulaire : 90 %

compartiment Q1 : 0,012 mg

d'où l'on déduit dans le système mamillaire :

$\alpha 12 = 3,75$
$\alpha 13 = 11,20$ (taux de renouvellement exprimés par jour)
$\alpha 21 = 1,05$
$\alpha 24 = 0,05$
Q2 = 0,041 mg

La production calculée aboutit à un renouvellement du stock globulaire un peu supérieur à 2 % par jour (vie globulaire moyenne = 45 jours, ce qui est le chiffre exact de la durée de vie des hématies du rat).

Le tableau 31, qui indique l'évolution en fonction du temps de l'activité non-héminique totale de l'organisme (colonne II) et de l'activité du pool Q2 du schéma mamillaire (colonne I), montre une concordance très nette de ces deux séries de chiffres : le sommet d'activité est pratiquement au même moment; le pour-

Tableau 31

VALEURS THEORIQUE (colonne I) ET "REELLE" (colonne II) DU POOL D'EQUILIBRE Q2 DEFINI PAR LE SCHEMA MAMILLAIRE CHEZ LE RAT NORMAL
(Valeurs exprimées en pourcentage de l'activité injectée)

Temps	I Valeur calculée	(a) Activité° intestinale	(b) Activité ° splénique	(c) Activité °° hépatique	(d) Activité ° médullaire	I I Somme de ces activités
1 h	11,2					
2 h	16,4					
4 h	19,5	2,9	3,7	4,0	10,8	21,4
6 h	19,2	4,2	3,7	4,1	10,4	22,4
8 h	17,9	3,5	3,6	4,1	7,2	18,4
12 h	15,6		3,5	4,1		
16 h	13,4	2,4	2,7	3,7	5	13,8
20 h	11,6		2,7	3,4		
24 h	10	1,9	2,4	3	2,1	9,4
30 h	7,9	1,4	2	2	1,5	6,9
40 h	5,5	1,1	1,7	0,7	1,2	4,8

° calcul de ces valeurs : voir texte.

°° soustraction de l'activité due aux réserves, dont l'accumulation est calculée à partir de la valeur α_{24}.

centage de l'activité totale injectée retrouvé dans les organes est très voisin de celui théoriquement déduit du calcul; la pente de décroissance est la même. Cette observation est très en faveur de la validité du schéma métabolique mamillaire.

f) Cinétique de l'incorporation globulaire du fer

La courbe expérimentale d'incorporation globulaire du fer peut être un moyen de vérifier la validité d'un modèle. Il est cependant difficile de dresser une courbe théorique, même chez le sujet normal, parce que diverses données sur la maturation de la lignée rouge sont insuffisamment précisées.

En théorie, s'il n'y a aucun compartiment entre plasma et hème, si la durée totale de la maturation est de 3,5 jours et le séjour médullaire des réticulocytes de 1,5 jour (données de LATHJA chez l'homme), la totalité de l'incorporation devrait être observée au 5ème jour, ou quelques heures plus tard puisque tout le fer plasmatique ne disparaît pas dès l'injection. En fait il faut tenir compte des autres données suivantes, non précisées parfaitement : hémolyse médullaire qui pourrait être normalement de l'ordre de 10 % des précurseurs érythroblastiques (mais à un moment inconnu de la maturation cellulaire), avidité plus grande pour le fer des cellules les plus jeunes, ce qui n'est d'ailleurs pas certain (7), possibilité pour certaines cellules de mûrir sans division et d'être donc excrétées de la moelle rapidement.

Nous avons utilisé dans notre travail le schéma métabolique de LATHJA (83) et nous avons cherché à tracer les courbes théoriques d'incorporation globulaire du fer dans les conditions suivantes :

- existence d'un modèle mamillaire
- existence d'un modèle caténaire où le pool Q2 est érythroblastique (120)
- existence d'un modèle caténaire où le pool Q2 est non érythroblastique (51) qu'il s'agisse de fer fixé à des cellules réticulaires de la moelle et directement transmis par celles-ci aux érythroblastes de l'îlot érythroblastique (14), ou qu'il s'agisse comme le suggère WINCHELL de fer du "milieu intérieur" de la moelle.

Les courbes calculées point par point ont été tracées et sont comparées sur la fig. 10 à la courbe expérimentale.

Le schéma caténaire avec pool érythroblastique est incompatible avec les faits. Il ne peut pas expliquer le fait que l'incorporation continue à augmenter au-delà du 5ème - 6ème jour chez l'homme normal; en effet dans ce modèle le retard à l'incorporation est dû pour l'essentiel à la durée de la maturation, et pour une faible partie seulement ($\alpha 21$ beaucoup plus petit que $\alpha 23$) à la remise en circulation de fer à travers le plasma à partir du pool labile érythropoïètique Q2.

Le schéma caténaire avec pool Q2 non érythroblastique entraînerait un retard excessif à l'incorporation parce que dans ce modèle Q2 est très volumineux. En outre la forme de la courbe n'est pas celle observée expérimentalement : la montée initiale est plus lente que ce qu'on observe en fait(fig. 10) ; il n'y a pas non plus cette lente et modeste montée terminale vue chez tous les sujets normaux entre le 8ème et le 12ème - 14ème jour. C'est d'ailleurs ce qu'on observe dans la courbe présentée par SHARNEY et coll. (176, IV), qui soutiennent cependant un modèle de type caténaire.

Le schéma mamillaire s'accorde assez bien aux faits expérimentaux. Comme les trois-quarts du fer plasmatique gagnent directement le compartiment d'utilisation, cela rend compte de la rapidité initiale de l'incorporation dont le seul retard est dû à la durée de la maturation. D'autre part, la réutilisation régulière, au hasard, du fer marqué initialement fixé dans le pool litéral Q2 explique la lente montée terminale.

Du fait des doutes portant sur diverses données de la cinétique de la multiplication érythrocytaire, cette concordance des courbes d'incorporation théorique et expérimentale n'a pas une valeur de preuve formelle. Selon le modèle choisi pour la vitesse de la maturation érythroblastique, la courbe expérimentale peut se rapprocher plus ou moins de la courbe théorique tracée à partir de tel ou tel schéma métabolique (51-176). L'accord nous paraît cependant meilleur entre la courbe expérimentale et la courbe théorique déduite du schéma mamillaire qu'entre la courbe expérimentale et les courbes théoriques déduites de tous les autres modèles.

Chapitre 3

SYSTEME DE COMPARTIMENTS METABOLIQUES DANS LES CONDITIONS PATHOLOGIQUES

Le système métabolique discuté plus haut est la forme la plus simple qui soit. Elle admet que l'ensemble du pool Q2 diffus est saturé en fer de la même façon et s'échange avec le plasma à la même vitesse (de sorte qu'il ne réalise qu'un seul pool dynamique).

Les faits observés sont cependant souvent plus complexes dans les conditions pathologiques.

1) Décroissance plasmatique à trois exponentielles

Alors que chez l'homme ou l'animal normal, la décroissance de l'activité plasmatique se fait selon un système de deux exponentielles, prouvant l'existence d'un seul pool métabolique échangeable, une composante exponentielle supplémentaire est constamment observée dans les circonstances suivantes :

- anémies hypochromes modérées, ou en cours de traitement, alors que les formes sévères non traitées ne montrent qu'un système de deux courbes dont la seconde est de pente rapide et de pourcentage élevé;

- hémochromatoses idiopathiques, caractérisées par un mouvement excessif de fer vers les réserves, surajouté à un mouvement normal vers l'érythropoïèse;

- aplasies ou grandes hypoplasies érythropoïètiques, où la mise en réserve quotidienne n'est pas excessive (mais les réserves ne sont pas utilisables puisque l'érythropoïèse est déficiente), et où le mouvement du fer vers les cellules rouges est quantitativement très diminué.

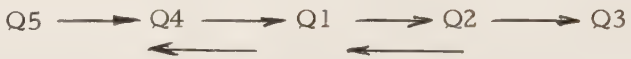
Dans ces trois états, très différents les uns des autres, on doit admettre que la réalimentation du fer se fait à partir d'un système de pools multiples : deux pools décelables, de taille et de vitesse de renouvellement différents.

2) Interprétation mathématique d'une courbe de renouvellement plasmatique à trois composantes exponentielles

La courbe observée peut se résoudre selon de multiples modèles à partir de l'équation :

$$A.\ e^{-\lambda 1t} + B.\ e^{-\lambda 2t} + C.\ e^{-\lambda 3t}$$

Le modèle caténaire, proposé par M. POLLYCOVE (120) ajoute au modèle caténaire simple discuté plus haut un mouvement symétrique vers des réserves Q5 :



Si on applique la transformation de LAPLACE au système d'équations différentielles on aboutit à calculer une suite de valeurs numériques

$$\begin{aligned}
a + b &= A\ (\lambda 2 + \lambda 3) + B\ (\lambda 1 + \lambda 3) + C\ (\lambda 1 + \lambda 2) \\
ab &= A\ (\lambda 2 + \lambda 3) + B\ (\lambda 1 + \lambda 3) + C\ (\lambda 1 + \lambda 2) \\
c &= \lambda 1 \lambda + \lambda 2 + \lambda 3 \\
d &= \lambda 1 \lambda 2 + \lambda 1 \lambda 3 + \lambda 2 \lambda 3 \\
e &= \lambda 1 \lambda 2 \lambda 3
\end{aligned}$$

Les flux du fer sont les suivants :

$$\alpha 12 = \frac{d - ef/a - e\,(1 - f) / b - b\,(c - b)}{a - b}$$

$$\alpha 14 = c - a - b - 12$$

$$\alpha 23 = f\ \left(\frac{e}{a\,\alpha 12}\right)$$

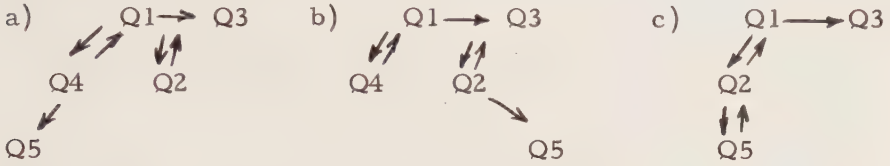
$$\alpha 45 = (1 - f)\ \left(\frac{e}{(b\,\alpha 14)}\right)$$

$$\alpha 41 = a - \alpha 45$$

La taille des compartiments échangeables Q2 et Q4, par rapport à Q1 (mesuré en mg de fer) est :

$$Q2 = \frac{\alpha\ 12\ Q\ 1}{b} \qquad Q4 = \frac{\alpha\ 14\ Q\ 1}{a}$$

Le modèle mamillaire peut être utilisé sous trois formes différentes :



Les modèles a) et b) sont semblables. Le modèle c) n'est que l'extension du modèle mamillaire simple au cas particulier où les réserves Q5 sont assez faibles pour s'échanger de façon visible sur les courbes d'activité plasmatique tracées pendant une période de 15 jours; dans le cas normal en effet on a admis que Q5 était si grand par rapport à Q1 et Q2 que l'échange Q5 Q1 ne pouvait pas être décelé par une exponentielle.

La résolution du modèle a (ou b) se fait à partir des mêmes valeurs de a, b, c, d et e que celles citées plus haut. On obtient les valeurs :

$$\alpha 21 = a$$

$$\alpha 12\ 21 = \frac{1}{(b - a)}\ b^2\ (c - a - b) + (ab - d)\ b + e$$

$$\alpha 12 = 12\alpha 21\ /\alpha 21$$

$$\alpha 14\ 41 = \frac{1}{(a - b)}\ a^2\ (c - a - b) + (ab - d)\ a + e$$

$$\alpha 13 = f\ (c - a - b - 12 - \frac{\alpha 14 \alpha 41}{b}$$

$$\alpha 14 = (1 - f)\ (c - a - b - 12) + f\ (\frac{\alpha 14\ \alpha 41)}{b}$$

$$\alpha 41 = \alpha 14 \alpha 41\ /\alpha 14$$

$$\alpha 45 = b - \alpha 41$$

$$Q2 = \frac{\alpha 12\ \ Q1}{\alpha\ 21} \qquad Q4 = \frac{\alpha 14\ \ Q1}{b}$$

Deux ordres de valeurs numériques pour les flux $\alpha 12, \alpha 21, \alpha 14, \alpha 41$ et $\alpha 45$ et pour les volume des pools Q2 et Q4 peuvent être obtenues selon que, dans le système de deux équations à deux inconnues (a + b) = ... et (ab) = ... , on choisit $a > b$ ou $a < b$. Dans un cas Q2 est grand à renouvellement lent et Q4 petit à renouvellement rapide; dans l'autre c'est l'inverse qui est observé.

3) Utilisation des différents modèles dans les conditions pathologiques

a) Exclusion du modèle caténaire

On a développé pourquoi chez le sujet normal il était impossible d'admettre l'existence d'un pool labile volumineux siégeant dans l'organe érythropoiètique. Ces raisons sont valables dans les cas pathologiques, qui amènent en outre d'autres arguments pour exclure un tel modèle.

Au cours des aplasies la présence de trois composantes exponentielles de renouvellement du fer plasmatique prouve que les deux pools labiles ainsi démontrés ne sont ni l'un ni l'autre érythroblastiques ; les pools Q2 et Q4 ne peuvent pas correspondre à un "érythropoïétic labile pool" (120). Dans le cas des anémies hypochromes hyposidérémiques en cours de traitement où le mouvement vers les réserves est nul (utilisation globulaire de 100 %), l'existence d'un système de trois courbes exponentielles prouve que l'apparition d'un nouveau pool en équilibre avec le plasma (par rapport avec l'état normal) n'indique pas obligatoirement l'ouverture d'un flux vers les réserves, comme certains avaient pu le penser (120). Le fait est confirmé par un état pathologique inverse du précédent, celui des anémies réfractaires sidéroblastiques (179) où nous avons observé comme d'autres que la décroissance du fer était bi-exponentielle, indiquant la présence d'un seul pool échangeable de fer, alors que le mouvement du fer vers les réserves est élevé.

L'interprétation des faits observés pour le renouvellement plasmatique de radio-fer paraît exiger de considérer l'ensemble des pools labiles échangeables avec le plasma comme un système diffus, tantôt homogène, tantôt hétérogène; mais telle composante d'une courbe de renouvellement plasmatique du fer n'a pas obligatoirement la signification de la mise en route d'une nouvelle voie métabolique; chaque cas doit être interprété

en fonction des faits cliniques, le même système pluriexponentiel pouvant être expliqué par différents modèles; l'un sera vraisemblable chez un sujet, illogique chez un autre.

b) Anémies hypochromes sidéropéniques

Dans l'anémie hypochrome franche, on constate l'existence de deux exponentielles de décroissance plasmatique de la radioactivité, la seconde ayant un taux et une pente d'autant plus élevés que l'hyposidérémie est plus franche. Ceci s'explique aisément dans le cadre du schéma mamillaire développé plus haut puisqu'ici Q2 est très petit et le mouvement vers les réserves est nul.

Mais, dans les hypochromies récemment traitées, ou dans les formes de modeste gravité, la décroissance plasmatique du fer se décompose parfois en trois e ponentielles. Nous considérons que dans ce cas, on se trouve dans une situation du type décrit dans le modèle mamillaire c). Les compartiments Q2 et Q5 sont très petits (Q2 = quelques milligrammes; Q5 = quelques dizaines de milligrammes); l'équilibre rapide Q2 → plasma (Q1) rend compte de la seconde exponentielle, de taux élevé et de pente faible; l'équilibre lent Q5 → Q2 → plasma explique la troisième courbe, de taux bas et de pente faible. Cette opinion est appuyée par les observations suivantes : utilisation à 100 % du fer pour l'hème, activité plasmatique nulle après le 10ème jour, grande rapidité de l'incorporation héminique du fer à cause du rapide renouvellement des compartiments non héminiques, absence après le 10ème jour de toute activité autre que celle circulante au niveau des aires hépatique et splénique.

c) Hémochromatoses idiopathiques

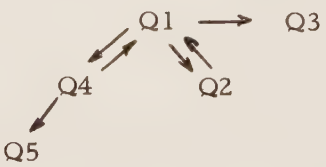
L'hémochromatose idiopathique est caractérisée par une viciation du métabolisme du fer qui est mis en excès en dépôt dans les réserves, alors que l'utilisation érythropoïètique est normale. Le mécanisme exact du trouble est inconnu; pour certains la maladie ne résulte que d'une anomalie d'absorption du fer; mais il semble plutôt exister une anomalie de l'activité de divers tissus de l'organisme pour le fer dont on retient pour preuve le taux élevé du renouvellement du fer qui contraste avec le taux bas observé dans les aplasies où la même hypersidérémie est notée (mais ici seulement comme conséquence de la non-utilisation du fer pour l'érythropoïèse). Le renouvelle-

ment plasmatique du fer montre toujours trois courbes exponentielles; la première et la troisième sont de pourcentage et de pentes analogues à celles observées chez les sujets normaux; il en apparaît une seconde, intermédiaire entre les deux précédentes.

un exemple en est donné ci-dessous :

courbe 1	74,2 %	λ^1= 18,5 (taux de renouvellement exprimés par jour)
courbe 2	24,6 %	λ^2= 4,1
courbe 3	1,2 %	λ^3= 0,27

Cette constatation impose l'idée d'une réalimentation du plasma à partir d'une double source, et l'hypothèse a été émise (120) que l'une d'entre elle était un pool labile interposé entre plasma et réserves, normalement peu fonctionnel. En fait l'hémochromatose ne diffère, sur le plan de la cinétique normale du fer, que par l'exagération d'un mouvement de mise en réserve (foie, toutes les glandes endocrines ...) qui existe à un moindre degré chez le sujet normal; par contre la surcharge en fer n'existe pas dans la moelle (sidéroblastose non augmentée, pas de dépôts de fer extra-érythroblastique). On peut supposer que dans ce cas le compartiment échangeable Q2 se dissocie en deux parties; celle médullaire garde une cinétique normale; celle non médullaire est sollicitée sans cesse par l'accélération du flux 45 et du fait de sa petite taille s'échange très vite avec le plasma :



Q2 (fraction médullaire du pool général Q2 du schéma simple, de renouvellement normal)

Q4 (fraction non médullaire, de renouvellement rapide)

Q5 (réserves très augmentées.)

En utilisant les chiffres cités plus haut du renouvellement plasmatique, on peut calculer des flux, et des volumes de pools labiles, compatibles avec cette conception.

$Q2 = 60$ mg $\quad \alpha 12 = 2,7 \quad \alpha 21 = 0,38$

$Q4 = 7,8$ mg $\quad \alpha 14 = 7,2 \quad \alpha 41 = 4,7 \quad \alpha 45 = 3,04$

Les courbes d'incorporation globulaire du fer, qui sont peu différentes de la normale, suggèrent que le retard à l'incorporation du à la présence des pools échangeables n'est guère modifié, donc que dans l'ensemble la cinétique de ces pools est normale; c'est effectivement le cas du pool Q2. Les courbes d'activité au niveau de l'aire hépatique montrent que le maximum d'activité est atteint avant la 20ème heure, ce qui implique que l'échange à travers Q4 n'a plus d'importance à partir de ce moment; ceci s'accorde avec l'observation d'un pool Q4 petit, vite vidé dans le compartiment stable Q5.

Cette observation peut être comparée avec celle des hémochromatoses par dysérythropoïèse, où la répartition de la surcharge est histologiquement plus diffuse (22, 179), et où la double exponentielle de la courbe de renouvellement plasmatique indique que le compartiment échangeable est unique sur le plan dynamique. Les données du calcul d'un cas typique, comparées à celles observées chez un sujet normal, sont les suivantes :

	sujet normal	dysérythropoïèse
mouvement de l'hème	39.2 mg/J	39.5 mg/J
$\alpha 12$	3.1	11.16
$\alpha 13$	13.1	4.9
$\alpha 21$	0.14	0.14
$\alpha 25$	0.23	0.11
Q1	3 mg	8 mg
Q2	39,3 mg	342 mg
mouvement vers Q5	9 mg/J	37,7 mg/J

Dans ce cas les courbes d'incorporation globulaire et les courbes d'activité de l'aire hépatique montrent deux différences majeures avec l'hémochromatose. L'incorporation globulaire est

très ralentie. Le maximum d'activité hépatique n'est atteint qu'après le 2ème - 3ème jour. Ces deux faits s'accordent avec le renouvellement lent d'un pool échangeable unique, volumineux, par lequel transitent environ 2/3 du fer qui quitte le plasma (dans le cas cité 11,16 / 16,06 = 70 %), contre à peine 1/4 chez le sujet normal (3,1 / 16,2 dans l'exemple indiqué plus haut).

La cinétique du fer rend donc pleinement compte des différences cliniques et évolutives de ces deux états. Deux modèles métaboliques différents doivent être employés pour les calculs et s'accordent bien avec tous les faits.

d) Aplasies érythropoïètiques

Dans l'aplasie érythropoïètique, une troisième courbe exponentielle s'intercale entre la courbe initiale ralentie et la courbe terminale très lente.

Un exemple est donné ci-dessous :

courbe 1 = 81,5 % λ_1 = 5,75

courbe 2 = 15,6 % λ_2 = 2,22 (taux de renouvellement exprimés par jour)

courbe 3 = 2,9 % λ_3 = 0,56

Ici, comme dans l'hémochromatose idiopathique, le modèle utilisé oblige à choisir entre deux solutions impliquant la dissociation en deux parties du compartiment dynamique échangeable avec le plasma.

Dans ce cas, à l'inverse de l'hémochromatose primitive, il est logique de considérer que le compartiment qui se dissocie par sa petite taille et ses échanges rapides du pool échangeable diffus est sa composante médullaire. En effet dans les aplasies pures la médiocre incorporation globulaire du fer se fait à une vitesse normale ou même augmentée; il n'y a donc pas de retard excessif à travers d'éventuels pools non héminiques à cinétique lente.

e) Intérêt de l'étude des systèmes complexes de renouvellement du radio-fer plasmatique

Les discussions concernant les systèmes à triple courbe exponentielle ont en fait un double intérêt.

D'une part elles permettent de choisir un modèle de résolution applicable au cas particulier du malade à explorer. Certes sur le plan clinique le choix du modèle a peu d'importance actuelle parce que le clinicien s'intéresse essentiellement à une valeur numérique, celle de la production érythropoïètique, et secondairement à une autre, celle du taux quotidien de la mise en réserve, qui peut guider dans les maladies avec surcharge en fer le rythme des saignées et la posologie des chélateurs; or ces deux chiffres sont les mêmes quel que soit le modèle utilisé. Les chiffres différents d'un modèle à l'autre sont ceux des compartiments intermédiaires et l'on voit encore mal actuellement une concordance entre le volume de ces compartiments et les faits cliniques. Cependant, dans les insuffisances médullaires, le dépouillement de 188 explorations paraît indiquer une nette différence dans le pronostic entre les formes où il existe une insuffisance quantitative de l'érythropoïèse - courbe à triple exponentielle, Q2 de petit volume - et les cas où le trouble paraît largement quantitatif - courbe à deux exponentielles, Q2 de grand volume, signes de lyse intra-médullaire - .

D'autre part, ces discussions portant sur des cas typiques irréalisables expérimentalement chez l'animal avec nos moyens actuels permettent de mieux fonder les conclusions tirées de l'étude du système simple évoqué dans le chapitre précédent. La dissociation du compartiment Q2 en deux pools de cinétique différente confirme l'hypothèse qu'il s'agit d'un système hétérogène au point de vue de sa localisation, ce que suggérait l'étude expérimentale. La vitesse de renouvellement de Q4 dans les cas où les décomptes externes montrent une vive montée de l'activité hépatique indique bien que ce fer intermédiaire est localisé en partie dans le foie, de même que l'effondrement de Q2 dans les aplasies médullaires indique qu'une large partie de ce pool est présente dans la moelle. La présence dans les plus grandes aplasies érythroblastiques d'un double système de courbes obligeant à individualiser deux compartiments échangeables est une preuve supplémentaire qu'aucun d'eux n'est exclusivement localisé aux organes érythropoïètiques. La va-

chiffres dresser les courbes expérimentales et discuter la valeur des courbes que nous avons choisies pour l'exploitation cinétique

Tableau 33

SUJET NORMAL		ANEMIE HYPOCHROME NON TRAITEE		APLASIE		DESERYTHROPOIESE		HEMOCHROMATOSE PRIMITIVE	
Temps après l'injection	Activité (2ml de plasma)	Temps après l'injection	Activité (2ml de plasma)	Temps après l'injection	Activité (2ml de plasma)	Temps après l'injection	Activité (2ml de plasma)	Temps après l'injection	Activité (2ml de plasma)
15 mn	2 200	15 mn	2 060	12 mn	1 799	12 mn	960	15 mn	1 110
45 mn	1 654	40 mn	771	48 mn	1 682	40 mn	698	46 mn	934
100 mn	976	89 mn	220	102 mn	1 501	94 mn	388	169 mn	519
175 mn	496	150 mn	102	156 mn	1 380	154 mn	189	276 mn	303
246 mn	267	244 mn	62	250 mn	1 185	245 mn	64	401 mn	171
317 mn	147	320 mn	41	340 mn	1 001	364 mn	22	20 h	17
22 h	24	20 h	1	480 mn	639	24 h	8	28 h	12,5
29 h	7	28 h	0	22 h	222	2 j	6,3	2 j	7,5
2 j	5,5	2 j	0	28 h	150	4 j	5,5	4 j	5
4 j	4			2 j	63	6 j	4,7	5 j	4,5
6 j	2,5			3 j	28	8 j	4	7 j	3,5
8 j	2			4 j	15			9 j	3
Courbes choisies 1 = 99,6 % T50 = 1,25 h 2 = 0,4 % T50 = 3 j incorporation 77 %		Courbes choisies 1 = 92,8 % T50 = 0,25 h 2 = 7,2 % T50 = 2,2 h incorporation 100 %		6 j 8 j Courbes choisies 1 = 62,8 % 4,6 h 2 = 34 % 11,5 h 3 = 3,2 % 50 h incorporation 2,5 %	7,5 4	Courbes choisies 1 = 99,2 % T50 = 0,93 h 2 = 0,8 % T50 = 246 h incorporation 33 %		Courbes choisies 1 = 97,3 % T50 = 2,17 h 2 = 2,2 % T50 = 15 h 3 = 0,5 % T50 = 8 j incorporation 52 %	

* Tous les chiffres donnés sont obtenus par deux comptages successifs de 30 minutes (compteur à scintillation automatique Tracerlab à spectromètre SC 76. Mouvement propre sur le pic choisi pour les comptages de fer 59 : 7,5 coups/mn). Les chiffres indiqués ont été corrigés pour l'équilibre final de l'activité plasmatique avec les réserves labiles (activité moyenne des 12ème et 14ème jour soustraite de l'activité réellement observée les jours précédents).

riation de taille du pool Q2 dans les conditions pathologiques empêche d'admettre l'hypothèse selon laquelle ce pool est le "milieu intérieur" de la moelle; celui-ci n'aurait aucune raison de s'effondrer dans les aplasies et devrait même augmenter de taille puisqu'il y a hypersidérémie.

Chapitre 4

LES RESERVES LABILES

L'un des problèmes cliniques importants posés par l'exploration par le fer 59 est de déterminer le volume des réserves. De celles-ci une partie est inappréciable, son renouvellement étant très lent, de l'ordre de 10 à 15 % par an (43); cette fraction correspond sans doute à l'hémosidérine, où le fer est dans un état chimique fixé (61). Une autre partie, que nous avons appelée Q5, est le compartiment lentement labile des réserves, en échange lent avec le plasma. D'un point de vue un peu finaliste, on peut concevoir le compartiment échangeable Q2 comme le volant régulateur quotidien du fer plasmatique, le compartiment des réserves labiles Q5 comme le volant régulateur utilisable pour les besoins graves (hémorragies chroniques, grossesse, carence ...).

Si ce compartiment s'échange avec le plasma, par l'intermédiaire du précédent (Q2, ou une fraction de Q2, Q4), l'équilibre avec le plasma doit entraîner une courbe exponentielle supplémentaire; c'est ce que nous avons admis dans les cas des anémies hypochromes hyposidérémiques en début de traitement où Q5 est petit. Chez le sujet normal et à plus forte raison dans les anémies avec surcharge de fer et dans les hémochromatoses Q5 est si volumineux par rapport à Q1 (rapport 100/1 chez le sujet normal, rapport 300 à 1000/1 dans les cas pathologiques) qu'une telle courbe si elle existe ne peut pas être observée expérimentalement.

Le calcul des réserves labiles admet qu'au 15ème jour de l'épreuve, chez l'homme, il existe un équilibre approximatif entre les réserves et le plasma. Le rapport entre l'activité initiale d'un ml de plasma et son activité à l'équilibre indiquera le rapport de volume entre le compartiment Q5 et le compartiment Q1, à condition de tenir compte du pourcentage du fer ayant gagné les réserves (ce pourcentage = 1-f, où f = frac-

tion du fer injecté ayant été utilisé au maximum pour la synthèse hémoglobinique). La formule est ainsi la suivante :

$$Q5\ (mg) = Q1\ (mg) \times (1 - f) \times \frac{\text{activité plasmatique à } t_o}{\text{activité plasmatique au J 15}}$$

Ce mode de calcul pêche triplement. D'une part, puisqu'il y a échange, il y a exponentielle et on devrait extrapoler celle-ci au temps 0; mais on ne sait pas la déterminer et la valeur "d'équilibre" au 15ème jour surestime le rapport réel Q5/Q1, d'autant plus que ce rapport sera moins élevé. Cependant comme on s'intéresse en clinique à la valeur de Q5 dans des états pathologiques avec surcharge de fer, (c'est-à-dire où la pente de la courbe doit être très faible), l'erreur est peu importante.

Une seconde cause d'erreur est que dans de nombreux états de dysérythropoïèse et dans une moindre mesure dans les anémies hypochromes et chez les sujets normaux (88, 90), des érythroblastes avortent pendant la maturation et libèrent ainsi du fer qui gagne le plasma; si ce mouvement Q3 vers Q1 est grand, une partie de l'activité plasmatique peut être liée à lui et le rapport d'activité jour 0/Jour 15 est alors minimisé. Ici encore on peut objecter que lorsque "l'hémolyse précoce" est importante on sait la détecter sur les courbes de décomptes externes et sur l'existence d'un ralentissement de l'incorporation globulaire du fer; par ailleurs il suffit alors de choisir pour dénominateur une valeur d'activité plasmatique très tardive, contemporaine d'un temps où il n'y a plus d'activité médullaire et plus de risque de remise en circulation de fer à partir de l'avortement dans la maturation.

La troisième cause d'erreur est due à l'ignorance du taux d'échange, lent mais certain (137), entre Q5 (réserves labiles) et Q6 (réserves fixes). Si par exemple pendant les 15 jours de l'épreuve un quart du fer radioactif de Q5 était passé dans l'état fixé qui caractérise Q6, l'équation "d'équilibre" entre Q5 et Q1 sous-estimerait du quart le volume réel de Q5. Cependant les travaux chimiques montrent une égalité approximative entre les réserves de fer ferritinique, forme chimiquement labile, et de fer hémosidérinique, forme chimiquement stable (136, 158); les mesures isotopiques des réserves labiles correspondent de très près au taux connu du fer ferritinique dans les divers états pathologiques et normaux; enfin les travaux de FINCH

(42) montrent un renouvellement du fer hémosidérin d'une période de plusieurs années chez le sujet normal, soit de moins de 1 % en 15 jours; le renouvellement est encore plus lent dans les hémochromatoses, même très énergiquement saignées. L'objection qui vient d'être présentée n'a donc pas de valeur pour une appréciation approximative du volume de Q5.

L'intérêt clinique du calcul de Q5 est évident. On a pu ainsi notamment mettre en évidence un effondrement de ces réserves chez des sujets peu ou pas hypochromes et chez lesquels Q1 (dont la modification est très rapide sous l'effet d'un traitement martial très court) était normal. A l'inverse le volume de Q5, connaissant le taux des mouvements quotidiens du fer vers les réserves, permet de dater approximativement le début d'une aplasie ou d'une dysérythropoïèse; quand on a pu confronter ces déductions avec des faits cliniques et hématologiques certains, on a noté qu'elles étaient exactes. Dans les hémochromatoses, le volume des réserves guide la thérapeutique; dans des cas où les réserves labiles sont basses après saignées, mais où la coloration de PERLS sur la biopsie de foie indique une forte surcharge, on peut penser que le fer est sous forme hémosidérinique fixée et que les chélateurs auront peu d'effet; cela a été vérifié cliniquement et par la mesure de la sidérurie sous desferrioxamine. Un cas particulier illustrant l'intérêt de la mesure de Q5 était celui d'une hémochromatose pulmonaire idiopathique, où tous les faits dynamiques étaient ceux d'une grande anémie hyposidérémique avec les réserves labiles nulles malgré la surcharge pulmonaire évidente radiologiquement et histologiquement; le fer était donc ici sous forme non échangeable; les chélateurs n'eurent aucun effet.

Quelques exemples de mesure du compartiment Q5 sont donnés ci-dessous (Tableau 32).

Tableau 32

VALEURS CALCULEES DU COMPARTIMENT DES RESERVES LABILES (Q5)

Sujet normal	500 mg
Anémie hypochrome en évolution	0
Anémie hypochrome récemment traitée	100 mg
Aplasie médullaire subaiguë récente	1 500 mg
Aplasie médullaire chronique (2 ans)	3 500 mg
Anémie hypochrome hypersidérémique de l'adulte °	8 000 mg
Hémochromatose idiopathique non traitée	4 000 mg
hémochromatose idiopathique saignée régulièrement depuis 8 ans	1 500 mg
Hémochromatose pulmonaire idiopathique	0

° Sujet décédé un an plus tard de diabète bronzé avec cirrhose.

Chapitre 5

DISCUSSION

Les faits rapportés ci-dessus aboutissent à un modèle physiologique simple et utilisable. Il répond aux conditions requises pour la validité de tout modèle :

- existence certaine et constante des compartiments suggérés par l'étude mathématique;

- taille des pools raisonnables, eu égard aux connaissances qu'on en a par d'autres méthodes dans les conditions normales et pathologiques;

- accord du modèle étudié avec les faits observés dans la cinétique, in vivo et in vitro, du fer radio-actif à travers l'organisme.

1) L'existence de compartiments métaboliques non héminiques est certaine et constante

L'existence d'une décroissance plasmatique du fer non exponentielle simple est un fait observé depuis longtemps (67, 106, 119, 134, 151) et sans exception, dans toutes les espèces étudiées (104, 118) et dans tous les cas pathologiques humains ou expérimentaux. De même on a remarqué très tôt que la courbe d'incorporation globulaire du fer n'atteint son maximum que tardivement, au delà des délais admis pour la maturation cellulaire complète de la cellule-souche au réticulocyte circulant (83, 140); ceci aussi est constant.

Le premier type d'explication fait appel à l'existence d'une érythropoïèse inefficace, avec mort cellulaire dans la moelle; celle-ci est déduite, non seulement d'observations cytologiques (15, 113), mais aussi de faits isotopiques utilisant la recherche d'une excrétion précoce de stercobiline marquée après ingestion de 15 N - glycine (56, 88, 90). Mais d'importants arguments plaident contre cette explication. L'hémolyse médullaire précoce est trop peu importante (10-15 % du total de l'hème formé) pour expliquer les faits observés chez l'homme normal (90, 162 bis); l'activité plasmatique excessive en résultant ne

saurait donner une vraie courbe exponentielle; la courbe exponentielle multiple est observée dans des aplasies érythroblastiques complètes où il ne pourrait exister d'érythropoïèse "inefficace" puisqu'il n'y a pas d'érythropoïèse du tout; dans les grandes hyposidérémies, la seconde courbe exponentielle due à la réalimentation plasmatique est observée dès la 3ème-4ème heure, ce qui ne saurait être dû à une hémolyse médullaire qui devrait être très précoce et massive. L'explication des faits cinétiques par l'érythropoïèse inefficace doit donc être rejetée. Par contre on doit garder ce phénomène à l'esprit pour l'interprétation des courbes d'incorporation globulaire du fer dans les cas pathologiques.

On a suggéré l'existence d'un shunt du plasma par utilisation directe du fer d'érythrocytes détruits par l'érythroblaste de l'îlot érythroblastique, via la cellule réticulaire de la moelle (15, 16). Ceci impliquerait que les calculs de synthèse d'hème à partir du mouvement du fer plasmatique sont inexacts par défaut, et que le renouvellement plasmatique du fer n'est pas un "index de l'érythropoïèse" (154). A cette possibilité on opposera les arguments suivants : le passage de fer de la cellule réticulaire à l'érythroblaste n'est pas observé dans les anémies hypochromes hyposidérémiques (16) où pourtant la synthèse d'hème est très active. Dans certains cas on a pu voir que la cellule érythroblastique recevait un matériel par rophéocytose à partir de la cellule réticulaire, mais pas de ferritine (139). In vivo, on a observé dans des cas particuliers une moelle dont les cellules réticulaires étaient très riches en fer, mais le compartiment plasmatique vide à cause de saignées; la synthèse d'hème ne reprenait que lorsque la sidérémie était relevée par un traitement martial, ce qui suggère la non-utilisation du fer des cellules réticulaires de la moelle (133); une situation du même ordre, quoique moins typique, est observée dans l'anémie des infections chroniques (fer des sidéroblastes normal ou diminué, fer extra-érythroblastique très augmenté - 157 -). Après injection de radio-fer par voie veineuse, on retrouve rapidement le fer dans les érythroblastes, notamment par autoradiographie (6, 7); in vitro le calcul de la synthèse d'hème par des réticulocytes ou des érythroblastes isolés à partir du fer plasmatique est de l'ordre de ce qui est estimé survenir in vivo (104); in vitro encore on a montré l'existence de sites spécifiques de fixation de la sidérophiline marquée à la membrane de la cellule rouge jeune (68) et un parallèlisme entre le taux de la fixation de la sidérophiline marquée à l'iode 131 et l'acti-

vité de synthèse de la cellule (69). Enfin les calculs du taux de synthèse d'hème à partir du radio-fer plasmatique donnent des chiffres remarquablement semblables à ceux déduits d'autres méthodes.

Une courbe comportant deux exponentielles pourrait être due à une cinétique différente des deux atomes de fer fixés à la protéine (99). Il existe effectivement une avidité plus grande des cellules utilisatrices pour le fer d'une transferrine saturée que d'une transferrine désaturée (68, 103) alors que le taux de fixation de la molécule protéique elle-même n'est pas modifié (69). Mais il y a seulement deux sites de liaison du fer à la transferrine alors qu'on voit souvent trois courbes de décroissance plasmatique de radio-fer. D'autre part la seconde courbe exponentielle est rapide et importante dans le cas des grandes hyposidérémies où la transferrine est désaturée et le fer qu'elle porte fortement lié.

La diffusion de la sidérophiline marquée hors du compartiment vasculaire et son équilibration avec un pool extracirculant ne peut pas non plus expliquer les faits; diverses expériences utilisant la sidérophiline iodée montrent que son compartiment métabolique extra-circulant est petit et s'équilibre vite avec le compartiment circulant (117, 156). Cette observation est confirmée par l'enregistrement de l'activité circulante après injection de plasma marqué, montrant l'équilibration dans les cinq premières minutes.

A l'inverse, de nombreux faits indiquent qu'il existe du fer non héminique dans de nombreuses cellules de l'organisme, sous des états chimiques différents, et qu'il est capable de s'échanger avec le plasma.

Il existe du fer non héminique dans l'intestin, sous au moins trois formes chimiques : ferritine (31, 53, 102) protéine non ferritinique (25), fer labile complexé avec des amino-acides (25). Du fer non héminique existe dans le foie, la rate, les cellules réticulaires de la moelle; il y comporte différentes formes chimiques, hémosidérine et ferritine plus ou moins en équilibre l'une avec l'autre (137); le fer ferritinique peut s'échanger avec le fer du plasma, que cet échange soit sous la dépendance (97) ou non (74, 172) de l'activité d'une xanthine-oxydase cellulaire; une partie au moins du fer ferritinique n'est pas un fer de simple stockage, mais c'est un compartiment "dyna-

mique" (96). Les cellules réticulaires, mais aussi l'érythroblaste (même s'il reçoit aussi de la ferritine déjà fabriquée par la cellule réticulaire voisine - 16 -), peuvent fabriquer de novo de l'apoferritine pour fixer le fer introduit éventuellement en excès (45, 53, 96). Enfin, dans l'érythroblaste, on a mis en évidence l'existence de fer non héminique ferritinique (15, 143) et non ferritinique (57, 91, 126), et les études cinétiques utilisant des traceurs suggèrent l'existence d'au moins deux compartiments métaboliques (2, 104).

La première condition nécessaire paraît donc remplie. L'interprétation selon laquelle la courbe exponentielle complexe de décroissance de la radioactivité plasmatique est due à l'équilibration avec des compartiments non héminiques s'accorde avec l'existence connue par ailleurs de ces compartiments. D'autre part aucune autre hypothèse proposée ne paraît pouvoir expliquer les faits observés.

2) Le volume des compartiments calculés n'est pas incompatible avec les faits connus par ailleurs.

Le volume des compartiments échangeables est mathématiquement déterminé, mais on ne peut pas comparer ce chiffre à un chiffre déduit d'expériences chimiques puisqu'on ne sait pas la nature chimique du fer de ces compartiments échangeables.

Le fer non héminique de la moelle a été estimé à 50-300 mg chez l'homme adulte (60), mais une partie de celui-ci est érythroblastique non échangeable (104); la ferritine des cellules réticulaires fonctionne apparemment comme réserve à renouvellement lent, le fer ne les quittant que lentement après les saignées (133). Une très petite partie de ce fer doit donc participer à l'échange rapide supposé par le schéma. Il en est de même dans les autres organes, où le fer dosé chimiquement est le fer total ou tout le fer soluble (fer de la ferritine), donnant un chiffre supérieur à celui des compartiments labiles. Force est donc de supposer que ce fer labile correspond, soit à une protéine particulière et de faible abondance, soit à des sites particuliers de l'apoferritine, d'où l'atome de fer pourrait être aisément mobilisable.

$$\text{plasma} \rightleftharpoons \underset{\text{inconnue}}{\text{protéine intermédiaire}} \longrightarrow \text{ferritine}$$

plasma ⇄ sites superficiels de la ferritine → sites profonds de la ferritine

Si on admet que la ferritine constitue le pool labile des réserves (Q4 du schéma simple discuté dans le chapitre 2), on peut tenter de répondre à cette question par l'expérimentation suivante. Après injection intra-cardiaque de radio-fer à des rats normaux on a prélevé à des temps variés la moelle d'un fémur et le foie et compté l'activité totale. La cristallisation d'hème sur une partie du matériel permet de mesurer par soustraction l'activité non-héminique. En mesurant, dans chaque échantillon, la radioactivité due à la ferritine cristallisée selon MACABIES (92), on obtient une courbe en fonction du temps qui, ou bien est semblable à celle du fer total non-héminique (et dans ce cas l'ensemble Q2 + Q4 serait la ferritine), ou bien est lentement progressive comme doit l'être le seul compartiment Q4 (et dans ce cas on déduirait que Q2 n'est pas ferritinique).

Les résultats suggèrent que le compartiment rapidement échangeable Q2 n'est pas ferritinique, ou bien que son fer est lié de façon très fragile à la molécule d'apoferritine et quitte la protéine au cours de manoeuvres de cristallisation qui comportent une dialyse, de sorte que l'activité ferritine, dans la moelle et dans le foie, représente moins de 10 % de l'activité totale non-héminique à renouvellement rapide. Ces résultats sont en accord avec ceux de BROWN (25) qui ne considère pas la ferritine comme un compartiment actif pour le transit intestinal du fer; de même n'avions-nous pas trouvé de marquage net de la ferritine cristallisée à partir de l'intestin après absorption digestive ou injection intra-veineuse de radiofer à l'animal (105). Ils s'accordent aussi avec nos observations (1ère partie) selon lesquelles le fer des compartiments intermédiaires intra-réticulocytaires n'est pas de la ferritine.

Quel qu'en soit la nature chimique, une toute petite partie seulement de l'ensemble du fer non héminique de l'organisme - 700 à 1500 mg - fait partie des pools à échange rapide (54).

Les quantités calculées du pool miscible des réserves concordent avec ce qui est connu comme pool ferritinique chez l'homme et chez l'animal (158). L'augmentation est nette dans les états de grande surcharge en fer, et s'accorde aux chiffres mesurés chimiquement dans les hémochromatoses (44). La séparation d'un compartiment miscible et d'un compartiment fixe s'accorde avec les faits connus concernant les deux formes

chimiques du fer de réserve, la possibilité plus grande de mobiliser par saignées le fer de la ferritine que le fer de l'hémosidérine, l'inefficacité des chélateurs dans les états de surcharge où le fer est sous forme hémosidérémique. On ne peut pas calculer par la méthode isotopique utilisée dans ce travail le volume du compartiment fixe parce que la période du fer 59 est trop courte pour l'étude d'un pool à renouvellement très lent; son estimation ne peut être donnée qu'à partir des faits biochimiques connus concernant la répartition ferritine/hémosidérine dans les conditions normales et pathologiques (136, 137, 158).

3) L'étude cinétique des mouvements du fer à partir du modèle considéré s'accorde avec les faits connus concernant la cinétique in vivo du fer.

Toute l'exploration physiologique de la cinétique du fer repose sur l'introduction directe du traceur dans le plasma. Or, chez le sujet vivant, l'apport du métal se fait surtout à partir des hématies détruites, permettant une économie de ce produit rare. Il est théoriquement possible qu'une partie de ce fer évite le plasma, et que l'exploration telle qu'elle est utilisée ne soit pas physiologique. On a résumé plus haut les arguments qui permettent de nier l'importance quantitative d'un mouvement direct du fer de la cellule réticulaire à l'érythroblaste (14, 16), chacun s'accordant au contraire actuellement à considérer le transit direct de fer à travers le plasma comme la seule voie utilisable à l'érythropoïèse (72 bis).

On peut considérer comme établi le fait que tout le fer fourni à l'érythropoïèse l'est à travers le plasma, donc que les conclusions quantitatives d'une épreuve qui utilise l'injection intra-veineuse du traceur sont valables. Cependant le fer radioactif fourni par les hématies marquées détruites ne gagne le plasma que progressivement et incomplètement (109) parce qu'il est dilué dans un pool s'équilibrant lentement avec le transporteur circulant; dans les hyposidérémies où tous les pools intermédiaires du fer sont petits et se renouvellent vite, le fer des hématies marquées détruites est utilisé rapidement et complètement pour l'érythropoïèse (109); dans les infections chroniques, son utilisation est au contraire retardée et diminuée (47 bis). Il serait donc important de mettre au point un test utilisable in vivo pour étudier la vitesse et le taux d'utilisation du fer à partir de cellules lisées dans les conditions pathologiques;

on pourrait sans doute identifier le pool de dilution de ce fer à l'un des pools échangeables mis en évidence par l'épreuve injectant le traceur directement dans le plasma; on mettrait aussi en évidence d'éventuelles anomalies de l'échange pool labile plasma. Il existe en effet des cas nombreux (notamment les infections chroniques) où la cinétique du fer plasmatique est celle d'une anémie hypochrome banale, mais où la cytologie et l'histologie montrent la présence de dépôts anormaux extra-érythroblastiques de fer, suggérant qu'une fraction du fer fourni à l'organisme par la destruction des hématies est exclue de l'utilisation à travers le plasma.

On peut conclure de ces observations que :

a) la voie plasmatique est la voie physiologique de l'utilisation du fer;

b) l'épreuve utilisant l'injection veineuse du traceur aboutit à un calcul exact de l'érythropoïèse;

c) dans certains cas pathologiques, une partie du fer fourni physiologiquement par la destruction des hématies peut être non-utilisable, alors que celui introduit directement dans le plasma a une cinétique normale.

Cette réserve faite, l'étude cinétique du radio-fer plasmatique permet de calculer le nombre, le volume et la vitesse de renouvellement de compartiments biologiques dynamiques. Le choix du modèle à utiliser a été longuement discuté plus haut, et on a développé les raisons qui ont amenées à proposer un modèle de type mamillaire. On a cru pouvoir choisir un tel modèle, où le compartiment non-héminique échangeable avec le plasma est placé 'en dérivation" sur la voie plasma → hème, sur les arguments suivants : calcul du flux quotidien de fer vers l'hème concordant avec les données d'autres méthodes de mesure, absence d'un mouvement direct d'échange entre cellules rouges et plasma in vitro, vitesse de la synthèse héminique dans les réticulocytes et les érythroblastes marqués empêchant d'admettre l'existence d'un pool non-héminique volumineux dans ces cellules, fixation de fer à partir du plasma dans des organes non-érythropoïètiques et échange de fer à partir de ceux-ci avec le plasma, cinétique de l'incorporation globulaire du fer. Une vérification directe était apportée par la mesure de la taille et de la vitesse de renouvellement du comparti-

ment de fer non-héminique échangeable de l'organisme; taille et cinétique sont semblables à celles de Q2 calculé selon le modèle mamillaire.

L'existence d'un pool échangeable de fer, diffus dans l'organisme, régularisant sans cesse la concentration en fer de la protéine de transport, est la caractéristique du modèle mamillaire. On peut comparer la régulation de la sidérémie à celle de la glycémie : alimentation discontinue à partir de l'intestin, utilisation permanente mais pouvant être irrégulière, régulation par équilibre avec un compartiment volumineux de glycogène. Le modèle est également observé dans d'autres étapes de la cinétique du fer : dans la paroi intestinale le transport est rapide mais se fait à un taux limité, l'excès de fixation cellulaire amenant une mise en réserve temporaire; dans la cellule rouge il existe aussi un rapide mouvement du fer fixé vers l'hème mais une partie du fer ne gagne l'hème qu'à travers un compartiment volumineux qui fonctionne comme réserve temporaire.

Il existe effectivement dans l'organisme du fer s'échangeant à un taux rapide avec le plasma. On a montré, chez la souris normale, une redistribution du radio-fer, via le plasma, à partir du foie, de la peau, des "organes résiduels" (86); le taux de fixation hépatique maxima observé (14 % de la dose injectée) est de l'ordre du taux trouvé chez le rat normal dans notre expérimentation, et correspond aussi grossièrement aux taux déduits à partir des décomptes externes. DONOHUE et coll. (33) ont aussi montré qu'environ 25 % du fer plasmatique s'échange avec d'autres organes que la moelle, dans diverses espèces animales. Dès 1957 également, SABRA et coll. ont noté que le pic d'activité mesurée dans le foie et la rate, chez les sujets normaux, était observée à la 12ème heure comme dans la moelle, mais qu'il y avait ultérieurement une rééquilibration au taux d'environ 20 % par jour (128), taux qui s'accorde avec celui défini par le calcul de $\alpha_2$1. Les courbes d'activité hépatique et splénique publiées par WASSERMANN et coll. (176) s'accordent aussi avec l'hypothèse d'un pool labile échangeable présent dans ces organes.

CONCLUSION

On a cherché dans ce travail à démontrer que toute la cinétique du fer était dominée par l'existence de compartiments échangeables, greffés sur la voie du transit de ce métal et permettant de régulariser en permanence le volume du pool de transport.

Dans la cellule rouge immature isolée, on a montré que la synthèse d'hème se faisait pour une large partie directement à travers un compartiment de très petite taille : une partie du fer fixé cependant suit un cheminement plus long, se diluant dans un pool volumineux à renouvellement lent. L'existence de cette réserve, sans cesse réalimentée à partir du fer extérieur, permet à la cellule de continuer la synthèse lorsque l'apport du fer est réduit ou supprimé. Il est en effet réduit dans le cas où la saturation en fer du milieu extérieur baisse, il est supprimé dans le cas où la cellule vieillit et ne peut plus mobiliser le fer qui se fixe à la membrane; dans ces deux circonstances la cellule continue une synthèse d'hème et peut complèter sa charge hémoglobinique.

Dans l'organisme entier, la cinétique du fer ne peut se résoudre par le système simple d'un pool de transport et de pools d'utilisation définitive (hème et réserves). La courbe de décroissance d'activité plasmatique et le retard observé à l'incorporation globulaire du fer ne peuvent s'expliquer que par l'existence d'un ou de plusieurs pools échangeables avec le plasma. Ces pools régularisent en permanence la sidérémie et retardent le transit du radio-fer entre son introduction et son utilisation.

On a cru pouvoir démontrer que le pool échangeable est diffus dans l'organisme, en partie médullaire extra-érythroblastique, en partie extra-médullaire, hépatique, splénique, intestinal. L'utilisation de ce modèle aboutit à calculer des taux quotidiens de synthèse d'hème et de mise en réserve qui s'accordent avec les mesures faites par d'autres méthodes.

Dans les conditions pathologiques, les flux de fer à travers les divers pools sont modifiés. In vitro on observe dans certains états une anomalie de la mise en réserve, aboutissant à

un gonflement anormal du pool non-héminique intra-cellulaire. In vivo on observe que le système des pools échangeables, qui se présentent chez le sujet normal comme un seul compartiment dynamique, se dissocie dans les conditions pathologiques en des compartiments multiples à cinétique différente; c'est le cas dans les aplasies médullaires graves où la partie médullaire du pool échangeable disparaît presque complètement, c'est le cas dans les hémochromatoses où la fraction hépatique de ce même pool se renouvelle à grande vitesse, étant sans cesse sollicité par un mouvement actif de mise en réserve.

La conception présentée permet de rendre compte de tous les faits connus par ailleurs sur la cinétique normale et pathologique du fer. Elle aboutit à calculer des taux d'érythropoïèse et de mise en réserve concordant avec ceux déterminés par d'autres méthodes. Elle indique qu'à tous les stades du transit du fer (traversée de la muqueuse intestinale au cours de l'absorption, traversée de l'organisme pour la mise à la disposition de la moelle, traversée de la cellule rouge pour gagner le lieu de la synthèse hémoglobinique) un même système régulateur existe : compartiment échangeable branché sur la voie rapide de transport.

BIBLIOGRAPHIE

1 ALLEN (D.W.)
Amino acid accumulation by human reticulocytes.
Blood 1960 - 16 - 1564

2 ALLEN (D.W.) JANDL (J.H.)
Kinetics of intracellular iron reticulocytes.
Blood 1960 - 15 - 71

3 ALLEN (E.H.) SHWEET (R.S.)
Synthesis of hemoglobin in a cell-free system.
J. Biol. Chem. 1962 - 237 - 760

4 ALPEN (E.L.) CRANMORE (D.)
Observation on the regulation of erythropoiesis and on cellular dynamics by Fe59 autoradiography.
in : Kinetics of cellular proliferation. Grune & Stratton ed. New York, 1959 p. 290

5 ARNSTEIN (H.R.V.)
The metabolism of glycin.
in : Advances in Protein Chemistry 1954 - 9 - 1

6 AUSTONI (M.)
Cytoautoradiography of Fe59 uptake by bone marrow cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956 - 92 - 6.

7 AUSTONI (M.) ZILIOTTO (D.)
Il ferro radio-attivo nello studio citochimico del midollo.
Acta Med. Patavina 1955 - 15 - 1.

8 AWAI (M.) BROWN (E.B.)
Studies of the metabolism of I_{131}-labeled human transferrin.
J. Lab. Clin. Med. 1963 - 61 - 363.

9 BANNERMAN (R.M.) GRINSTEIN (M.) MOORE (C.V.)
Haemoglobin synthesis in thalassaemia. In vitro studies.
Brit. J. Haemat. 1959 - 5 - 102.

10 BEHRENDT (H.)
Chemistry of erythrocytes.
C.C. Thomas ed. Springfield 1957.

11 BERNARD (J.), BESSIS (M.), BOIRON (M.), LORTHOLARY (P.), NAJEAN (Y.), MALASSENET (R.)
I - Les anémies hypochromes hypersidérémiques
Rev. Hémat. 1960 - 15 - 341

II - Les anémies normochromes sidéroblastiques réfractaires.
Nouv. Rev. Fr. Hémat. 1963 - 3 - 465.

12 BERTHES (J.F.) BECK (W.S.)
Biochemical aspects of reticulocyte maturation. Fate of the ribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 1962 - 237 - 3770.

13 BERTINCHAMPS (A.J.) COTZIAS (G.C.)
Dosimetry of radioisotopes.
Science 1959 - 128 - 988.

14 BESSIS (M.)
L'îlot érythroblastique, unité fonctionnelle de la moelle osseuse.
Rev. Hémat. 1958 - 13 - 8.

15 BESSIS (M.) BRETON-GORIUS (J.)
Le cycle du fer dans l'organisme révélé par la microscopie électronique.
Path. Biol. 1957 - 14 - 2173.

16 BESSIS (M.) BRETON-GORIUS (J.)
Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy.
Blood 1962 - 19 - 635.

17 BETHARD (W.)
Iron metabolism and iron deficiency.
in : Mechanisms of anemia. Mac Graw ed. New York 1962

18 BEUTLER (E.)
Tissue effects of iron deficiency.
in : Iron Metabolism. Ciba Symposium. Springer-Verlag ed. Berlin. 1964 p. 256.

19 BEUTLER (E.) DRENNAN (W.) BLOCK (M.)
The bone marrow and liver in iron deficiency anemia.
J. Lab. Clin. Med. 1954 - 43 - 427

20 BLOCK (W.D.) HUBBARD (R.W.)
Amino-acid content of rabbit urine and plasma.
Arch. Bioch. Bioph. 1962 - 96 - 557

21 BONNET (J.D.) ORVIS (A.L.) HAGEDORN (A.B.) OWEN (C.A.)
Rate of loss of radioiron from mouse and man
Am. J. Physiol. 1960 - 198 - 784

22 BOTHWELL (T.H.) FINCH (C.A.)
Iron metabolism.
1 vol. 400 p. Little, Brown ed. Boston 1962.

23 BROWN (H.) BROWN (J.)
Utilization of globin peptides in hemoglobin synthesis in vitro.
Metabolism 1961 - 10 - 91.

24 BROWN (E.B.) JUSTUS (B.W.)
In vitro absorption of radio-iron by everted pouches of rat intestine.
Am. J. Physiol. 1958 - 194 - 319.

25 BROWN (E.B.) ROTHER (M.L.)
Studies of the mechanism of iron absorption.
I. Iron uptake by the normal rat.
J. Lab. Clin. Med. 1963, 62 - 357.

26 BURNHAM (B.F.) LASCELLES (J.)
Control of porphyrin biosynthesis through a negatiove feedback mechanism.
Biochem. J. 1963 - 87 - 462.

27 CHARLEY (P.) ROSENSTEIN (M.) SHORE (E.) SALTMAN (P.)
The role of chelation and binding equilibria in iron metabolism.
Arch. Bioch. Biophys. 1960 - 88 - 222.

28 CLARK (P.) WALSH (R.J.)
Haem synthesis in vitro.
Austr. J. Med. 1960 - 38 - 135

29 CROME (P.) MOLLISON (P.L.)
Splenic destruction of Rh-sensitized, and of heated red cells.
Brit. J. Haemat. 1964 - 10 - 137

30 CROSBY (W.H.)
Evidence of the recycling of siderocyte iron.
J. Clin. Invest. 1959 - 38 - 997

31 CROSBY (W.H.
The control of iron balance by the intestinal mucosa.
Blood 1963 - 22 - 441.

32 DERN (R.J.) HART (W.L.)
Studies with doubly labeled iron. Simultaneous liquid scintillation counting of isotopes Fe55 and Fe59 as ferrous perchlorate.
J. Lab. Clin. Med. 1961 - 57 - 320.

33 DONOHUE (D.M.) GABRIO (B.W.) FINCH (C.A.)
Quantitative measurements of haemopoietic cells of the marrow .
J. Clin. Invest. 1958 - 37 - 1564.

34 DRESCH (C.)
Etude du métabolisme du fer au cours de diverses circonstances pathologiques.
Thèse Méd. Paris, 1964.

35 DRESEL (E.I.)
The role of some porphyrins and porphyrin precursors in the biosynthesis of haem.
in : Porphyrin biosynthesis and metabolism.
J.A. Chruchill ed. Londres,1955

36 DRESEL (E.I.B.) FALK (J.E.)
Studies on the biosynthesis of blood pigments. Haem synthesis in haemolysed erythrocytes of chicken blood.
Bioch. J. 1954 - 56 - 156

37 DUBACH (R.) MOORE (C.V.) CALLENDER (S.T.)
Studies of iron transportation and metabolism. IX. The excretion of iron as measured by the isotope technique.
J. Lab. Clin. Med. 1955 - 45 - 599

38 ERIKSEN (L.)
The effect of lead on the in vitro biosynthesis of heme and free erythrocyte porphyrins.
Scand. J. Clin. Labor. Invest. 1955 - 7 - 80.

39 ERSLEV (A.J.)
Erythropoietin in vitro.
in : Erythropoiesis. Grune & Stratton ed. New York, 1962 p. 275

40 ERSLEV (A.J.) HUGUES (J.R.)
The influence of environment on iron incorporation and mitotic division in a suspension of normal bone marrow.
Brit. H. Haemat. 1960 - 6 - 414

41 FALBE-HANSEN (I.) LOTHE (K.)
Incorporation of radio-iron into erythrocyte non haem iron and hemoglobin under normal and pathological conditions.
C.R. 8° Congrès Soc. Europ. Hémat. - Vienne, 1961

42 FINCH (C.A.)
Physiopathologic mechanisms of iron excretion.
in : Iron Metabolism, Springer-Verlag ed., Berlin 1964 p. 452

43 FINCH (C.A.) LÖDEN (B.)
Body iron exchange in man.
J. Clin. Invest. 1959 - 38 - 392

44 FINCH (S.C.) FINCH (C.A.)
Idiopathic hemochromatosis, an iron storage disease. Iron metabolism in hemochromatosis.
Medicine 1955 - 34 - 381

45 FINEBERG (R.A.) GREENBERG (D.M.)
Ferritin biosynthesis.
J. Biol. Chem. 1955 - 214 - 91

46 FISHER (H.)
Hemin.
Org. Synth. 1941 - 21 - 53

47 FRANCOIS (P.E.) SZUR (L.)
Use of iron 52 as a radioactive tracer.
Nature 1958 - 182 - 1665

47bis FREIREICH (E.J.) MILLER (A.) EMERSON (C.P.) ROSS (J.F.)
The effect of inflammation on the utilization of erythrocyte and transferrin-bound radioiron for red cell production.
Blood 1957 - 12 - 972

48 GAJDOS (A.) GAJDOS-TOROK (M.)
Etude in vitro de la cinétique des différentes étapes de la synthèse de l'hème par les globules rouges au cours des anémies et des polyglobulies.
Nouv. Rev. Fr. Hémat. 1962 - 2 - 563

49 GAJDOS-TOROK (M.)
Contribution à l'étude de la biosynthèse de l'hème.
Thèse Sciences. Paris - 1959

50 GARBY (L.) NOYES (W.D.)
Studies on hemoglobin metabolism. Pathways of hemoglobin iron metabolism in normal man.
J. Clin. Invest. 1959 - 38 - 1484

51 GARBY (L.) SCHNEIDER (W.) SUNDQUIST (O.) VUILLE (J.C.)
A ferro-erythrokinetic model and its properties.
Acta Physiol. Scand. 1963 - suppl. 216

52 GOLDBERG (A.)
The enzyme formation of haem by the incorporation of iron into protoporphyrin.
Brit. J. Haemat. 1959 - 6 - 150

53 GRANICK (S.)
Increase of the protein apoferritin in the gastro-intestinal mucosa as a direct response to iron feed.
J. Biol. Chem. 1946 - 164 - 737

54 GRANICK (S.)
Porphyrin biosynthesis. Porphyria diseases, and induced enzyme synthesis in chemical porphyria.
Trans. N.Y. Acad. Sc. 1962 - 25 - 53

56 GRAY (C.H.) NEUBERGER (A.) SNEATH (P.H.A.)
Studies in congenital porphyria. Incorporation of 15 N in the stercobilin in the normal and the porphyric.
Bioch. J. 1950 - 47 - 87

57 GREENOUGH (W.B.) PETERS (T.) THOMAS (E.D.)
An intracellular protein, intermediate for hemoglobin formation.
J. Clin. Invest. 1962 - 41 - 1116

58 GRINSTEIN (M.) BANNERMAN (R.M.) MOORE (C.V.)
The utilization of protoporphyrin 9 in heme synthesis.
Blood 1959 - 14 - 476

59 GRINSTEIN (M.) MOORE (C.V.)
Studies in iron transportation and metabolism.
J. Clin. Invest. 1949 - 28 - 505

60 HALLGREN (B.)
Haemoglobin formation and storage iron in protein deficiency.
Acta Soc. Med. Upsal. 1953 - 59 - 79

61 HARRISON (P.M.)
Ferritin and haemosiderin.
in : Iron Metabolism. Ciba Symposium. Springer-Verlag ed. Berlin, 1964 - p. 40

62 HAUT (A.) CARTWRIGHT (G.E.) WINTROBE (M.M.)
Electrophoresis of non hemoglobin proteins from concentrated hemoglobin-free hemolysates.
J. Lab. Clin. Med. 1964 - 63 - 279

63 HEILMEYER (L.)
Human hyposideraemia.
in : Iron Metabolism. Ciba Symposium. Springer-Verlag ed. Berlin, 1964 - p. 201

64 HILL (A.S.) HAUT (A.) CARTWRIGHT (G.E.) WINTROBE (M.M.)
The role of non hemoglobin proteins and reduced glutathione in the protection of hemoglobin from oxidation in vitro.
J. Clin. Invest. 1964 - 43 - 17

65 HORST (W.) VILLANUEVA-MEYER (H.)
Ein neues Radioeisensatzstudium zur klinischen Diagnostik des Fe-Stoffwechssels.
Stralentherapie 1957 - 102 - 398

66 HUFF (R.L.) HENNESSY (T.G.) AUSTIN (R.E.) GARCIA (J.F.) ROBERTS (B.M.) LAWRENCE (J.H.)
Plasma and red cell iron turnover in normal subjects and in patients having various hematopoietic disorders.
J. Clin. Invest. 1950 - 29 - 1041

67 HUFF (R.L.) JUDD (O.J.)
Kinetics of iron metabolism.
in : Advances in Biological and Medical Physics.
Academic Press ed. New York, 1956 - p. 223.

68 JANDL (J.H.) INMAN (J.K.) SIMMONS (R.L.) ALLEN (D.W.)
Transfer of iron from serum iron binding protein to human reticulocytes.
J. Clin. Invest. 1959 - 38 - 161

69 JANDL (J.H.) KATZ (J.H.)
The plasma-to-cell cycle of transferrin .
J. Clin. Invest. 1963 - 42 - 314

70 JENSEN (W.N.) ASHENBRUCKER (H.) CARTWRIGHT (G.E.) WINTROBE (M.M.)
The uptake in vitro of radioactive iron by avian erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 1953 - 42 - 833

71 KASSENAAR (A.) MORELL (H.) LONDON (I.M.)
The incorporation of glycine into globin and synthesis of heme in vitro in duck erythrocytes.
J. Biol. Chem. 1957 - 229 - 423

72 KATZ (J.H.) JANDL (J.H.)
The role of transferrin in the transport of iron.
in : Iron Metabolism. Ciba Symposium. Springer-Verlag ed. Berlin 1964 - p. 103

72bis KATZ (J.H.)
The delivery of iron to the red cell.
C.R. 10° Cong. Int. Hemat. Stockholm - 1964

73 KIKUCHI (G.) KUMAR (A.) TALMAGE (P.) SHEMIN (D.)
The enzymatic synthesis of delta amino levulinic acid.
J. Biol. Chem. 1958 - 233 - 1214

74 KINNEY (T.D.) KAUFMAN (N.) KLAVINS (J.V.)
Xanthine oxidase activity and iron storage in liver.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1961 - 108 - 2683

75 KLEIN (J.R.)
Protoporphyrin and heme formation by erythrocytes from the X-irradiated and bled duck.
Am. J. Physiol. 1961 - 201 - 663

76 KOREY (S.R.) LEVINE (B.)
Effect of iron on the biosynthesis of hepatic apoferritin.
J. Clin. Invest. 1955 - 34 - 756

77 KORMAN (S.)
Iron metabolism in man
Ann. N.Y. Acad. Sc. 1960 - 88 - 460

78 KRUH (J.) DREYFUS (J.C.) ROSA (J.) SCHAPIRA (G.)
Synthèse de l'hémoglobine par des systèmes acellulaires de réticulocytes.
Bioch. Bioph. Acta 1962 - 55 - 690

79 KRUH (J.) DREYFUS (J.C.) SCHAPIRA (G.)
Non uniform incorporation of phenylalanine and tyrosine into rabbit hemoglobin in vitro and in vivo.
J. Biol. Chem. 1960 - 235 - 1075

80 LABBE (R.F.) HUBBARD (N.)
Metal specificity of the iron-protoporphyrin chelating enzyme.
Bioch. Bioph. Acta 1961 - 52 - 130

81 LABBE (R.F.) HUBBARD (H.)
Preparations and properties of the iron-protoporphyrin chelating enzyme.
Bioch. Bioph. Acta 1960 - 41 - 185

82 LABBE (R.F.) NISHIDA (G.)
A new method of hemin isolation.
Bioch. Bioph. Acta 1956 - 26 - 437

83 LATHJA (L.G.) OLIVER (R.)
Studies on the kinetics of erythropoiesis. A model of the erythron.
in : Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis.
Churchill ed. Londres 1960 - p. 289

84 LABUE (J.) DORNFEST (B.S.) GORDON (A.S.) HURST (J.) QUASTLER (H.)
Marrow distribution in rat femurs determined by cell enumeration and Fe59 labeling.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1963 - 112 - 1058

85 LOCHEAD (A.C.) GOLDBERG (A.)
Mechanisms in the transfer of protein-bound iron for haem synthesis.
Clin. Science 1963 - 24 - 229

86 LOCKNER (D.) SLETTEN (K.) de HEVESY (G.)
Studies on cancer anemia.
Brit. J. Cancer 1963 - 17 - 328

87 LONDON (I.M.) SHEMIN (D.) RITTENBERG (D.)
The in vitro synthesis of heme in the human red blood cells of sickle cell anemia.
J. Biol. Chem. 1948 - 173 - 797

88 LONDON (I.M.) SHEMIN (D.) WEST (R.) RITTENBERG (D.)
Heme synthesis and red blood cell dynamics in normal humans and in subjects with polycythemia vera, sickle-cell anemia and pernicious anemia.
J. Biol. Chem. 1949 - 179 - 463.

89 LONDON (I.M.) SHEMIN (D.) RITTENBERG (D.)
Synthesis of heme in vitro by the immature non-nucleated mammalian erythrocyte.
J. Biol. Chem. 1950 - 183 - 749

90 LONDON (I.M.) WEST (R.) SHEMIN (D.) RITTENBERG (D.)
On the origin of bile pigment in normal man.
J. Biol. Chem. 1950 - 184 - 351

91 LOTHE (K.) FALBE-HANSEN (I.)
Incorporation of 59 Fe into erythrocyte non haem iron and haemoglobin in anaemic and lead-poisoned rabbits.
Clin. Science 1963 - 24 - 47

92 MACABIES (J.) MAGNAN DE BORMIER (B.) ORSETTI (A.)
Montpellier Medical 1958, 53, 5

93 MALAMOS (B.) GYFTAKI (E.) PRONKAKIS (C.)
The iron uptake by reticulocytes in normal subjects, in subjects with thalassemia minor and in patients with thalassemia major.
Acta Haemat. 1963 - 29 - 80

94 MAUZERALL (D.)
Normal porphyrin metabolism.
J. Pediatrics 1964 - 64 - 5

95 MAZUR (A.) CARLETON (A.)
Relation of ferritin iron to heme synthesis in marrow and reticulocytes.
J. Biol. Chem. 1963, 238 - 1817

96 MAZUR (A.) CARLETON (A.) CARLSEN (A.)
Relation of oxydative metabolism to the incorporation of plasma iron into ferritin in vivo.
J. Biol. Chem. 1961 - 236 - 1109

97 MAZUR (A.) GREEN (S.) SAHA (A.) CARLETON (A.)
Mechanism of release of iron in vivo by xanthine oxidase.
J. Clin. Invest. 1958 - 37 - 1809

98 MIHRE (E.)
Iron uptake by human erythroid cells in vitro.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1964 - 16 - 201

99 MONTI (A.) GLYNN (M.F.) DERN (R.J.)
Studies with doubly labeled iron. An evaluation of ferrokinetic data obtained with various chemical forms of tracer iron.
J. Lab. Clin. Med. 1963 - 61 - 272

100 MORELL (H.) SAVOIE (J.C.) LONDON (I.M.)
The biosynthesis of heme and the incorporation of glycine into globin in rabbit bone marrow in vitro.
J. Biol. Chem. 1958 - 233 - 923

101 MORGAN (E.H.) LAURELL (C.B.)
Studies on the exchange between transferrin and reticulocytes.
Brit. J. Haemat. 1963 - 9 - 471

101bis MORGAN (E.H.)
The interaction between rabbit, human and rat transferrin and reticulocytes.
Brit. J. Haemat. 1964 - 10 - 442

102 MOURIQUAND (C.) PUJALET-PLAA (G.)
L'excrétion duodénale du fer chez le cobaye en surcharge ferrique.
C.R. Soc. Biol. 1960 - 154 - 983

103 NAJEAN (Y.) ARDAILLOU (R.) BERNARD (J.)
Etude de l'influence du plasma sur l'utilisation globulaire du fer in vitro.
I Etude physiologique
Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 1960 - 5 - 783

II Etude physio-pathologique
Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 1962 - 7 - 605

104 NAJEAN (Y.) ARDAILLOU (N.) MULMANN (M.)
Etude des compartiments non héminiques du fer.
I Explorations faites in vivo
Nouv. Rev. Fr. Hémat. 1963 - 3 - 17

II Cinétique du fer et synthèse héminique in vitro dans le réticulocyte normal.
Nouv. Rev. Fr. Hémat. 1964 - 4 - 31

105 NAJEAN (Y.)
Cinétique du transit intestinal du fer.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1964 - 9 - 874

106 NAJEAN (Y.) BOIRON (M.)
Utilisation du fer radioactif pour le calcul de l'érythropoïèse. Désaccord des résultats fournis par cette technique avec les données classiques du métabolisme du fer.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1958 - 4 - 72

106bis NAJEAN (Y.) ARDAILLOU (N.) DRESCH (C.) TUBIANA (M.)
Technique d'étude de l'érythropoïèse à l'aide du fer radioactif.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1965 - 10 - 321

107 NAKAO (K.) PIZAK (L.) BETHARD (W.)
Comparison of in vitro and in vivo radioiron uptake by pigeon erythrocytes.
Science 1954 - 120 - 260

108 NIZET (A.) LAMBERT (S.)
Isolement d'un facteur plasmatique intervenant dans la synthèse de l'hémoglobine.
Bull. Soc. Chimie Biol. 1954 - 36 - 1279

109 NOYES (W.D.) BOTHWELL (T.H.) FINCH (C.A.)
The role of the reticulo-endothelial cell in iron metabolism.
Br. J. Haemat. 1960 - 6 - 43

110 OLIVIER (R.) LATHJA (L.G.)
Biological half-life of radio-iron in man.
Nature 1959 - 184 - 1882

111 PAOLETTI (C.) BOIRON (M.) TUBANIA (M.) TRUHAUT (R.) BERNARD (J.)
Fer plasmatique et synthèse de l'hémoglobine.
Sang 1958 - 29 - 492

112 PAOLETTI (C.) DURAND (M.) GOSSE (Ch.) BOIRON (M.)
Absence de consommation de la sidérophiline au cours de la synthèse de l'hémoglobine in vitro.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1958 - 3 - 259

113 PEABODY (F.W.) BROWN (G.O.)
Phagocytosis of erythrocytes in the bone marrow, with special reference to pernicious anemia.
Am. J. Path. 1925 - 1 - 169

114 PEASE (D.C.)
An electron microscopic study of red bone marrow.
Blood 1956 - 11 - 501

115 PERKOFF (G.T.) SCHWARTZ (H.C.) TYLER (F.H.)
Incorporation of radioiron into myoglobin in an in vitro system.
J. Clin. Invest. 1959 - 38 - 1599

116 PLANAS (J.) CASTRO (S. de) RECIO (J.M.)
Serum iron and its transport mechanism in the fowl.
Nature 1961 - 189 - 668

117 POLLYCOVE (M.)
Iron kinetics.
in : Iron metabolism. Springer-Verlag ed. Berlin, 1964
p. 148

118 POLLYCOVE (M.) MAQSOOD (M.)
Existence of an erythropoietic labile iron pool in animals.
Nature 1962 - 194 - 152

119 POLLYCOVE (M.) MORTIMER (R.)
The quantitative determination of individual iron kinetics and hemoglobin formation in human subjects.
Clin. Res. Proc. 1956 - 4 - 51

120 POLLYCOVE (M.) MORTIMER (R.)
The quantitative determination of iron kinetics and hemoglobin synthesis in human subjects.
J. Clin. Invest. 1961 - 40 - 753

121 POWNSER (E.R.) BERMAN (L.)
The effect of erythropoietin on erythroblast maturation in bone marrow cultures.
in : Erythropoietin. Grune & Stratton ed. New York, 1962
p. 286

122 RABINOVITZ (M.) OLSON (M.E.)
Participation of reticulocyte microsomes in the incorporation of iron into haemoglobin.
Nature 1958 - 181 - 1665

123 RANNEY (H.M.) KONO (P.)
Studies of the incorporation of Fe 59 into normal and abnormal hemoglobins.
J. Clin. Invest. 1959 - 38 - 508

124 RIMINGTON (F.R.S.)
Connaissances récentes sur la biosynthèse des porphyrines et de l'hème.
Rev. Hémat. 1957 - 12 - 591

125 RIMINGTON (C.) PELNARD-CONSIDERE (M.) FALLOT (P.)
Renouvellement de la catalase hépatique du rat intoxiqué par le sédormid.
in : 2° Colloque International de Biologie de Saclay. C.N.R.S. ed. Paris, 1962 - p. 149

126 SALERA (U.)
Introduction to the general discussion.
in : Iron Metabolism. Springer-Verlag ed. Berlin, 1964 p. 178

127 SALERA (U.) MAGNANELLI (P.) AVINO (R. d') ZECCA (I.) MATCOVICH (A.L.)
Ferrokinetics in the bone marrow.
C.R. 8° Congrès Europ. Hemat. Vienne 1961.

128 SALERA (U.) TAMBURINO (G.)
Il metabolismo del ferro nei suoi rapporti con la eritropoïesi fisiologica. La reserva marziale.
Haematologica 1957 - 42 - 1359

129 SANO (S.) GRANICK (S.)
Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation.
J. Biol. Chem. 1961 - 236 - 1173

130 SCHAPIRA (G.) DREYFUS (J.C.) KRUH (J.)
The interconversion of aminoacids after their incorporation into haemoglobin and myosin.
Biochem. J. 1962 - 82 - 290

131 SCHWARTZ (H.C.) HILL (R.L.) CARTWRIGHT (G.E.) WINTROBE (M.M.)
The stimulation of heme synthesis by globin.
Bioch. Bioph. Acta 1959 - 36 - 567

132 SCOTT (J.J.)
The metabolism of -amino-levulinic-acid
in : Porphyrin biosynthesis and metabolism.
Churchill ed. Londres, 1955

133 SHAHIDI (N.T.) NATHAN (D.G.) DIAMOND (L.K.)
Iron deficiency anemia associated with an error of iron metabolism in two siblings.
J. Clin. Invest. 1964 - 43 - 510

134 SHARNEY (L.) SCHWARTZ (L.) WASSERMAN (L.R.) PORT (S.) LEAVITT (D.)
Pool systems in iron metabolism with special reference to polycythemia vera.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954 - 87 - 489

135 SHEPPARD (C.W.)
Basic principles of the tracer method.
Wiley ed. New-York - 1962

136 SHODEN (A.) GABRIO (B.W.) FINCH (C.A.)
The relationship between ferritin and hemosiderin in rabbits and man.
J. Biol. Chem. 1953 - 204 - 823

137 SHODEN (A.) STURGEON (P.)
Iron storage. The influence of time on the redistribution of excess storage iron.
Am. J. Path. 1958 - 34 - 1139

138 SONDHAUS (C.A.) THORELL (B.)
Microspectrophotometric determination of non heme iron in maturing erythroblasts and its relationship to the endocellular hemoglobin formation.
Blood 1960 - 16 - 1285

139 SORENSON (G.D.)
An electron microscopic study of hematopoiesis in the yolk sac.
Labor. Invest. 1961 - 10 - 178

140 STOHLMANN (F.)
Erythropoiesis.
New England J. Med. 1962 - 267 - 392

141 SUIT (H.D.) LATHJA (L.G.) OLIVER (R.) ELLIS (F.)
Studies on 59 Fe uptake by normoblasts and the tailure of X-irradiation to affect uptake.
Brit. J. Haemat. 1957 - 3 - 165

142 THOMAS (E.D.) LOCHTA (H.L.) STOHLMANN (F.)
Attempts to develop an in vitro system for the assay of erythropoietin.
J. Lab. Clin. Med. 1960 - 55 - 311

143 TISHKOFF (G.H.)
Nature chimique et métabolisme du fer non héminique dans les stromas érythrocytaires.
Rev. Hémat. 1958 - 13 - 493

144 TUBIANA (M.) DUTREIX (J.) DUTREIX (A.) JOCQUEY (P.)
Bases physiques de la radiothérapie et de la radiobiologie
Masson edit. Paris 1963

146 TUBIANA (M.) FRINDEL (E.)
Etude du cycle intestinal du fer.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1961 - 6 - 276

147 TURNBULL (A.) GIBLETT (E.R.)
The binding and transport of iron by transferrin variants.
J. Lab. Clin. Med. 1961 - 57 - 450

148 VAN DYKE (D.C.) ANGER (H.) POLLYCOVE (M.)
The effect of erythropoietic stimulation on marrow distribution in man, rabbit and rat as shown by Fe_{59} and Fe_{52}.
Blood 1964 - 24 - 356

149 VAVRA (J.D.) MAYER (V.K.) MOORE (C.V.)
I In vitro heme synthesis by human blood. Abnormal heme synthesis in thalassemia major.
J. Lab. Clin. Med. 1964 - 63 - 736
II In vitro porphyrin synthesis by human blood. Porphyrin synthesis by thalassemic erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 1964 - 63 - 754

150 VOGEL (W.) RICHERT (D.A.) PIXLEY (B.C.) SCHULMANN (M.P.)
Heme synthesis in iron deficient duck blood.
J. Biol. Chem. 1960 - 235 - 1769

151 WALLERSTEIN (R.O.) POLLYCOVE (M.)
Bone marrow hemosiderin and ferrokinetics patterns in anemia.
A.M.A. Arch. Int. Med. 1958 - 101 - 418

152 WALSH (R.J.) THOMAS (E.D.) FLUHARTY (R.G.) FINCH (C.A.)
Iron metabolism. Heme synthesis in vitro by immature erythrocytes.
Science 1949 - 110 - 396

153 WALTER (H.) ZIPPER (H.)
Utilization of serum-protein-bound glycine in the formation of globin and haem.
Bioch. J. 1962 - 84 - 531

154 WASSERMAN (L.R.) RASHKOFF (I.A.) LEAVITT (D.) MAYER (J.) PORT (S.)
The rate of removal of radioactive iron from the plasma. An index of erythropoiesis.
J. Clin. Invest. 1952 - 31 - 32

155 WASSERMAN (L.R.) SHARNEY (L.) SCHWARTZ (L.) KRIEGER (D.) PORT (S.) LEARITT (D.)
Application of a two pool theory to iron turnover rates.
5° Congr. Int. Hémat. Paris 1954.

156 WASSERMAN (L.R.) SHARNEY (L.) WEINTRAUB (L.R. SCHWARTZ (L.) TENDLER (D.)
Interstitial fluid as a significant pool in iron kinetics.
C.R. 9° Congr. Int. Hémat. Mexico 1962

157 WEINFELD (A.) HANSEN (H.A.)
Further studies on the interrelationship between hemosiderosis and sideroblasts in bone marrow smears.
Acta Med. Scand. 1962 - 171 - 23

158 WOHLER (F.) OTTE (W.) FULGRAFF (M.)
Zur Pathologie des Speichereisens.
Acta Haemat. 1961 - 25 - 337

159 WRANNE (L.)
Free erythrocyte copro- and protoporphyrin.
Acta Paediatr. 1960 - suppl. 124

160 YONEYAMA (Y.) MATSUI (I.) OHYAMA (H.) YOSHIKAWA (H.)
Indirect role of ferritin and transferrin in heme synthesis.
Acta Haemat. 1963 - 29 - 129

161 ZAIL (S.S.) CHARLTON (R.W.) TORRANCE (J.D.) BOTHWELL (T.H.)
Studies on the formation of ferritin in red cell precursors.
J. Clin. Invest. 1964 - 43 - 670

162 CHISOLM (J.J.)
Disturbances in the biosynthesis of heme in lead intoxication.
J. Ped. 1964 - 64 - 159

162bis CRONKITE (G.P.) FLIEDNER (T.M.) STRYCKMANS (P.) CHANANA (A.D.) CUTTNER (J.) RAMOS (J.)
Flow patterns and rate of human erythropoïesis and granulocytopoïesis.
C.R. X° Int. Cong. Hemat. Stockholm 1964

163 GAJDOS (A.) GAJDOS-TOROK (M.)
Etude de l'activité de l'acide aminolévulinique-synthétase dans les mitochondries des hépatocytes de lapin et de rat blanc intoxiqués par l'acétate de plomb.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1964 - 9 - 629

164 JOHNSON (A.) JONES (O.T.G.)
Enzymic formation of haem and other metalloporphyrins.
Bioch. Biophys. Acta 1964 - 93 - 171

165 KRUH (J.) SCHAPIRA (G.) LAREAU (J.) DREYFUS (J.C.)
Activation de la synthèse acellulaire de l'hémoglobine par l'acide ribonucléique.
Action de fractions d'acide ribonucléique de réticulocytes obtenues par centrifugation en gradient de saccharose.
Biochim. Biophys. Acta 1964 - 87 - 669

166 LICHTMAN (H.C.) FELDMAN (F.)
In vitro pyrrole and porphyrin synthesis in lead poisoning and iron deficiency.
J. of Clin. Invest. 1963 - 42 - 830

167 MATIOLI (G.T.) EYLAR (E.H.)
The biosynthesis of apoferritin by reticulocytes.
Bull. Nat. Acad. Sc. 1964 - 52 - 508

168 NEWMAN (E.B.) MAGASANIK (B.)
The relation of serine-glycine metabolism to the formation of single-carbon units.
Biochim. Biophys. Acta 1963 - 78 - 437

169 POLLACK (S.) KAUFMAN (R.M.) CROSBY (W.H.)
An investigation of exchange of iron across the intestinal mucosa.
J. of Lab. and. Clin. Med. 1964 - 63 - 847

170 PRINCIOTTO (J.V.) RUBIN (M.) SHASHATTY (G.C.) ZAPOLSKI (E.J.)
The transfer of iron to reticulocytes by synthetic chelating agents.
J. Clin. Invest . 1964 - 43 - 825

171 RIFKIND (R.A.) DANON (D.) MARKS (P.A.)
Alterations in polyribosomes during erythroid cell maturation.
J. Cell. Biol. 1964 - 22 - 599

172 STROHMEYER (W.G.) STEPHEN (A.) MILLER SCARLATA (W.R.) MOORE (W.E.) GREENBERG (S.M.) CHALMERS (C.T.)
Effects of hypoxia on iron absorption and mobilization in the rat.
Am. J. Phys. 1964 - 207 - 55.

173 VIVADER (A.G.)
Transport of glycine by pigeon red cells.
Biochem. 1964 - 3 - 662

174 WALDRON (H.A.)
The effect of lead on the fragility of red cell incubated in vitro.
J. Clin. Path. 1964 - 17 - 405

175 WASSERMAN (L.R.) SHARNEY (L.) GEVIRTZ (N.R.) SCHWARTZ (L.) WEINTRAUB (L.R.) TENDLER (D.) DUMONT (A.E.) DREILING (D.) WITTE (M.)
The exchange of iron with interstitial fluid.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1964 - 115 - 817

176 WASSERMAN (L.R.) SHARNEY (L.) GEVIRTZ (N.R.) SCHWARTZ (L.) WEINTRAUB (L.R.) TENDLER (D.) DUMONT (A.E.) DREILING (D.) WITTE (M.)
Studies in iron kinetics
I Interpretation of ferrokinetic data in man - J. Mount Sinaï. Hosp. 1965 - 32 - 262.

II Interpretation of experimental data in terms of multiple pool systems.
J. Mount Sinaï. Hosp. 1965 - 32 - 305.
III Formulation of the models of iron metabolism - J. Mount Sinaï. Hosp. 1965 - 32 - 323.
IV Calculation of physiological parameters on the bases of multiple pool models - J. Mount Sinaï. Hosp. 1965 - 32 - 338.

177 YONEYAMA (Y.) MATSUI (L.) OHYAMA (H.) YOSHIKAWA (H.)
Indirect role of ferritine and transferrin in heme synthesis
Acta Haemat. 1963 - 29 - 129

178 ZAMBONI (L.) PEASE (D.C.)
The vascular bed of bone marrow.
Ultrastructure Res. 1961 - 5 - 65

179 Symposium on sideroblastic anaemia.
Brit. J. Haemat. 1965 - 11 - 41

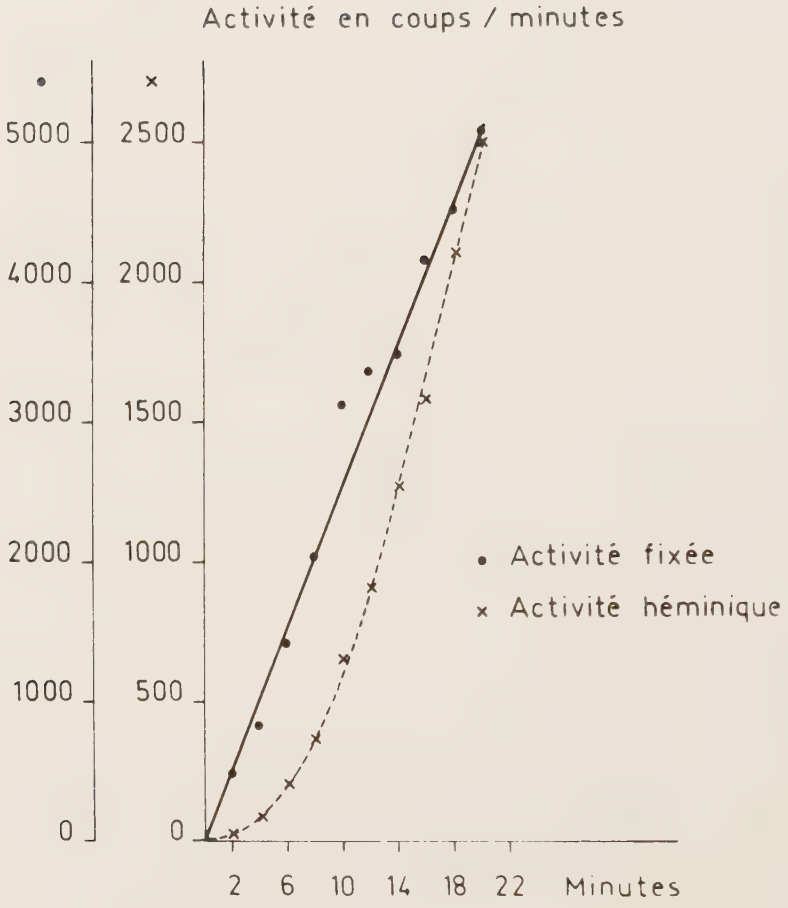


Fig. 1 Incubation en plasma marquée interrompue à des intervalles de temps très bref. La courbe de synthèse d'hème des 10 premières minutes montre le retard du à la traversée d'un pool de petit volume par le fer radioactif fixé (sang de rats normaux).

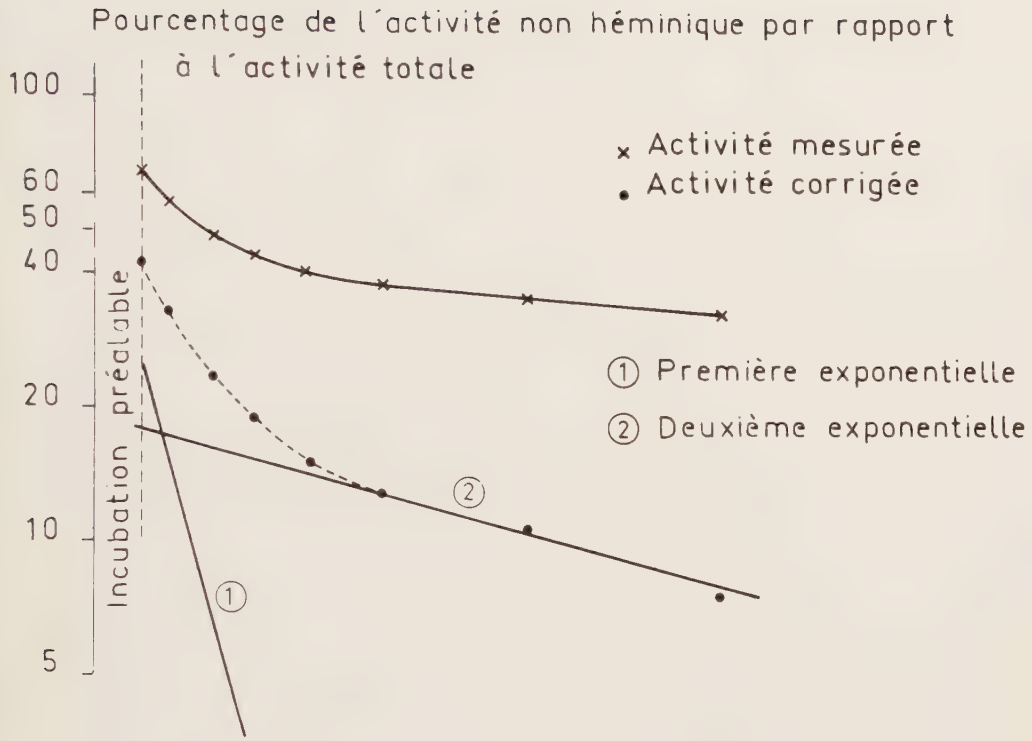


Fig. 2 Disparition de l'activité non héminique au cours d'une incubation en plasma non marqué (réticulocytes d'anémie hémolytique humaine).
L'activité mesurée a été corrigée en soustrayant des chiffres obtenus ceux de l'activité résiduelle après 4 heures d'incubation (activité fixée non mobilisable in vitro, représentant dans ce cas 25 % de l'activité totale du culot cellulaire).

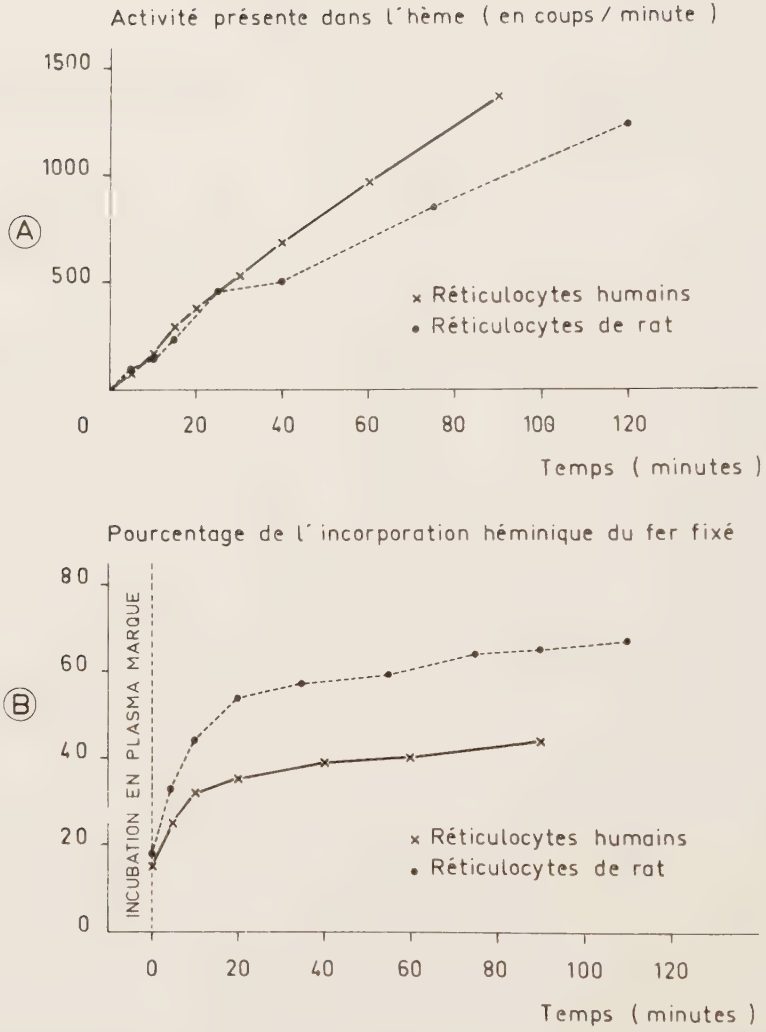


Fig. 3 Incorporation du radio fer dans l'hème in vitro.

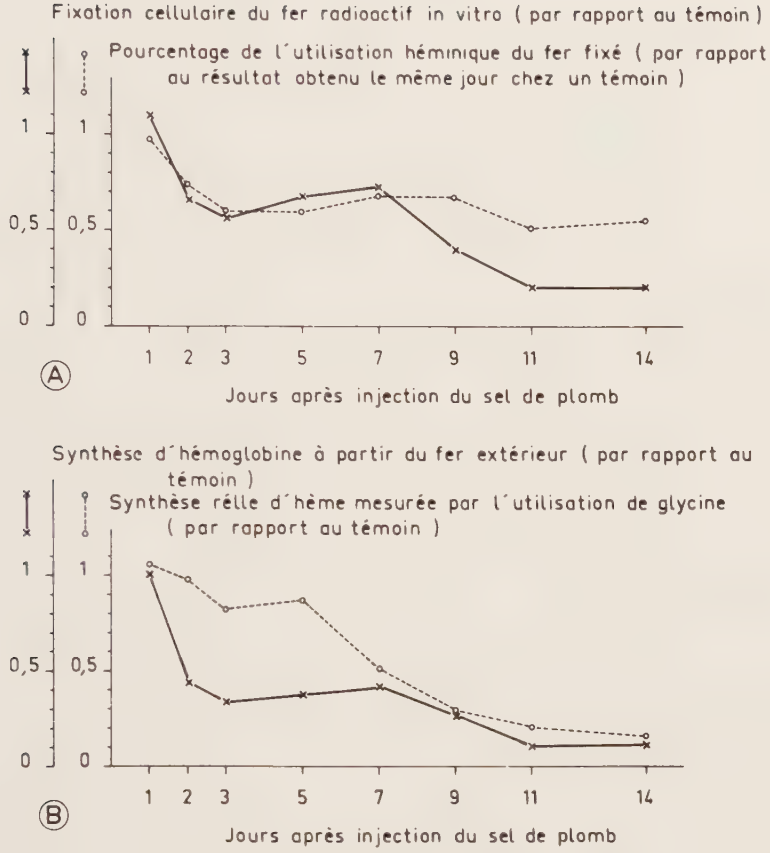


Fig. 4 Utilisation du fer et synthèse d'hémoglobine in vitro dans les réticulocytes de rat saturnins.

A - Baisse de la fixation cellulaire de fer et baisse du taux d'utilisation de ce fer (la réticulocytose est cependant 3 fois plus élevée que chez le témoin).

B - Baisse du taux de la synthèse réelle d'hémoglobine.

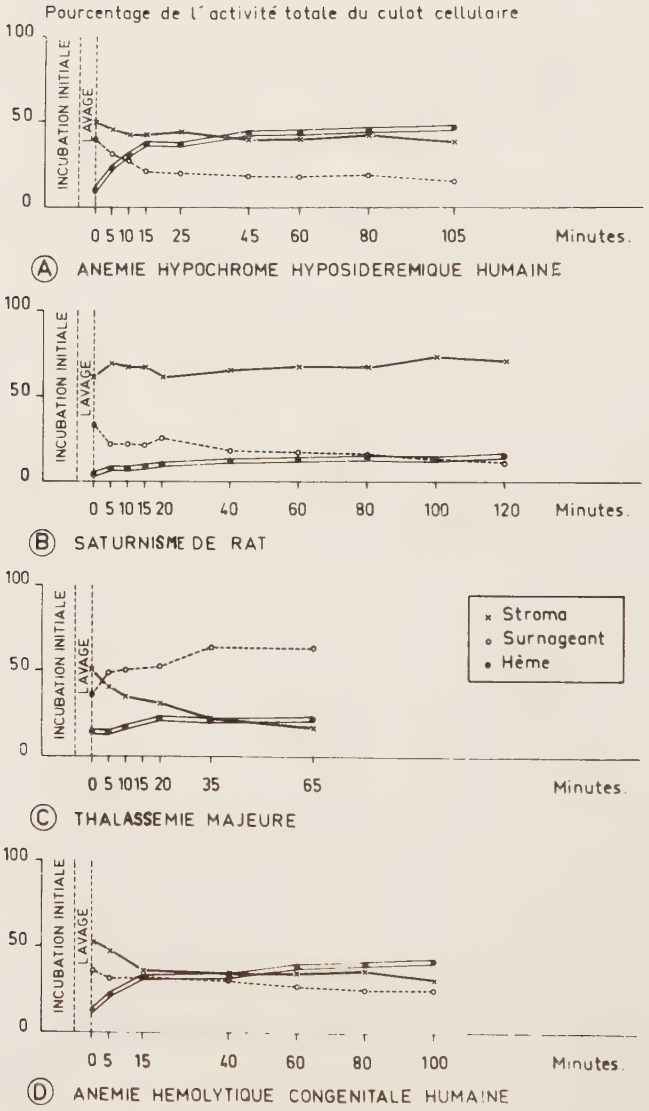
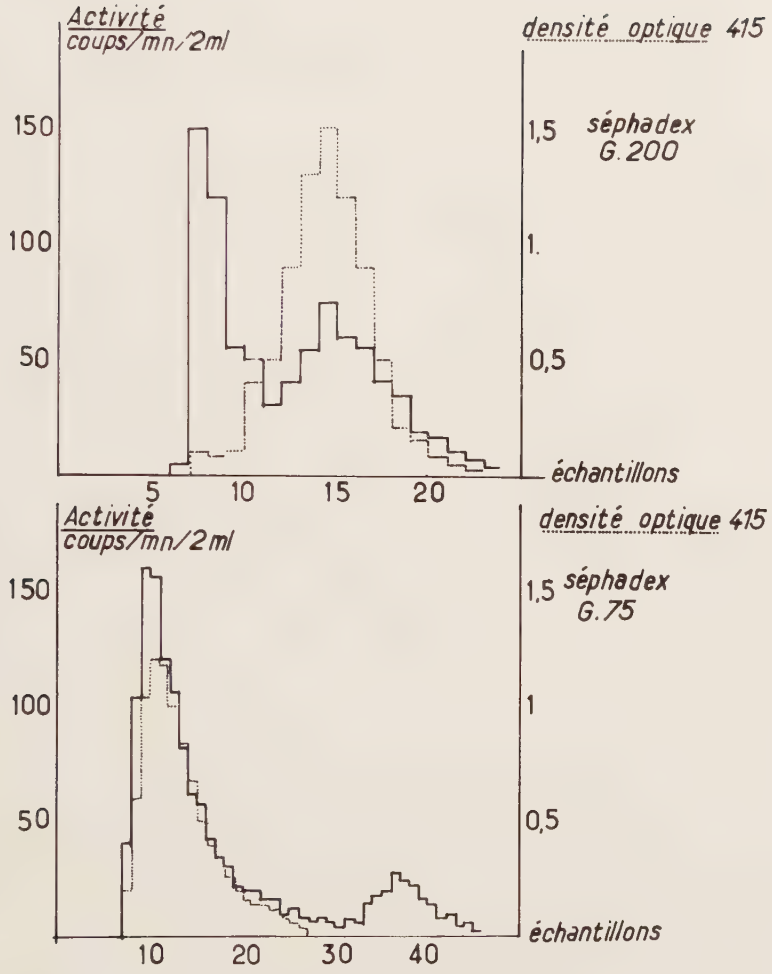


Fig. 5 Localisation de l'activité non héminique dans les réticulocytes de divers états pathologiques, après une courte incubation en présence de traceur radioactif.

A


Activité
coups/mn/2ml
densité optique 415
150
100
50
1,5
1.
0,5
séphadex
G.200
échantillons
5
10
15
20
Activité
coups/mn/2ml
densité optique 415
150
100
50
1,5
1
0,5
séphadex
G.75
échantillons
10
20
30
40

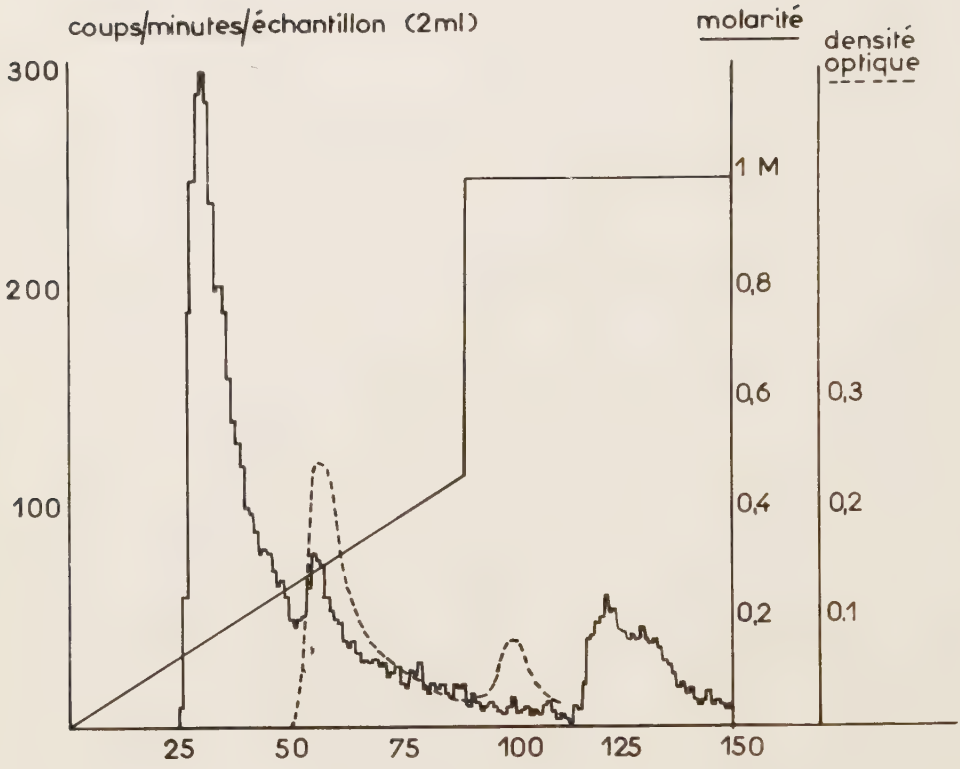


Fig. 6 A - Chromatographie sur Sephadex d'un hémolysat de réticulocytes de rat ayant incubé en présence de plasma marqué par fer 59 (CNK 10^{-3}M bloquant la synthèse héminique, dans ce cas valant 10 % de l'activité totale).

B - Chromatographie sur DEAE - Cellulose en gradient de molarité (tampon phosphate pH 6,5) - hémolysat de réticulocytes de rat préparé dans les mêmes conditions (pourcentage d'activité dans l'hème : 2 % de l'activité totale).

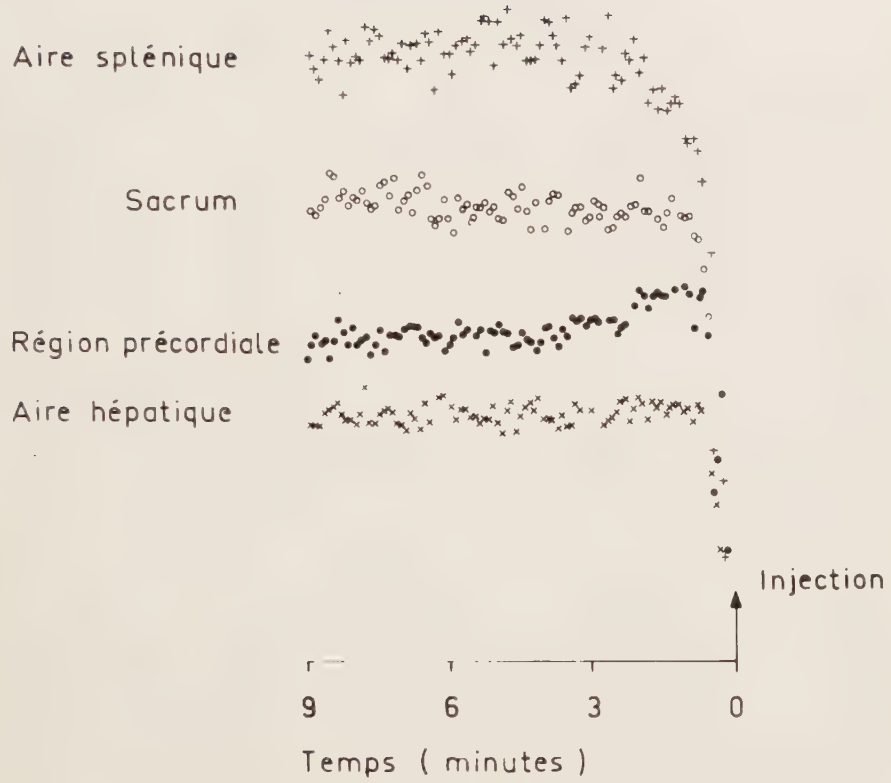


Fig. 7 Evolution de la radioactivité mesurée simultanément au-dessus des aires précordiale, sacrée, splénique, et hépatique (L'inertie des intégrateurs est de 5 secondes - L'activité mesurée se traduit par 1 cm pour 100 C/Sec. pour les trois premières aires étudiées, et par 1 cm pour 300 c/Sec. pour l'aire hépatique. Lecture des courbes de droite à gauche).

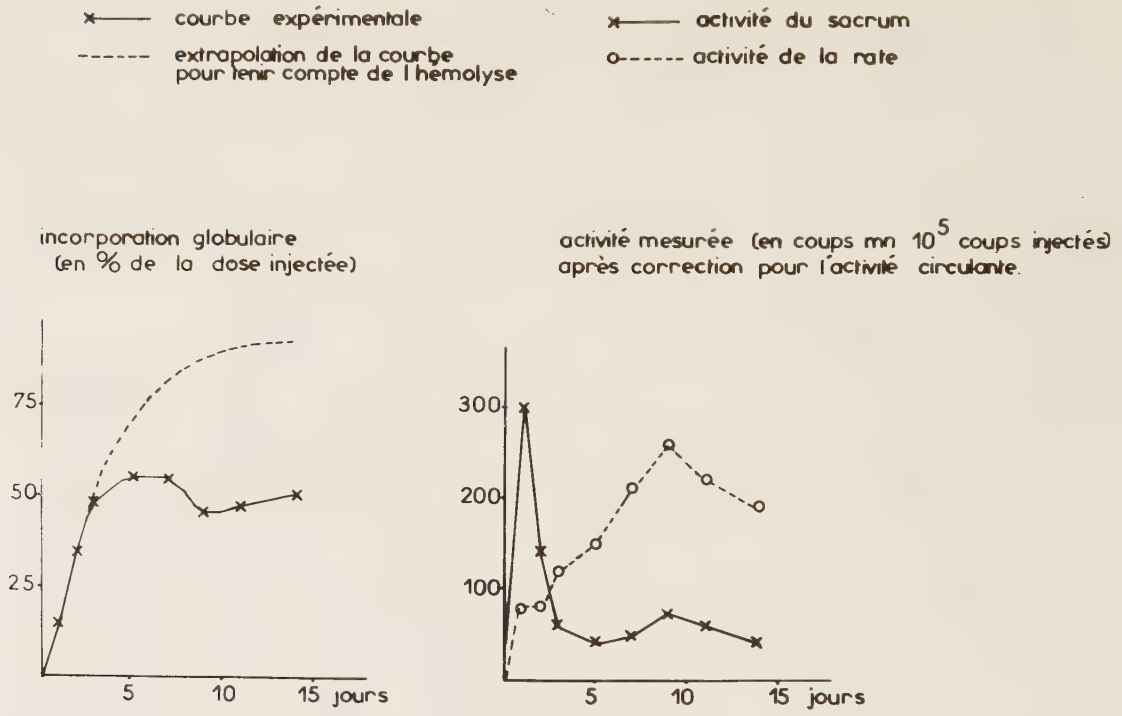


Fig. 8 Cinétique de l'incorporation du fer in vivo dans une anémie hémolytique microsphérocytaire congénitale sévère (T 50 par Cr 51 en auto-transfusion 5,5 jours).

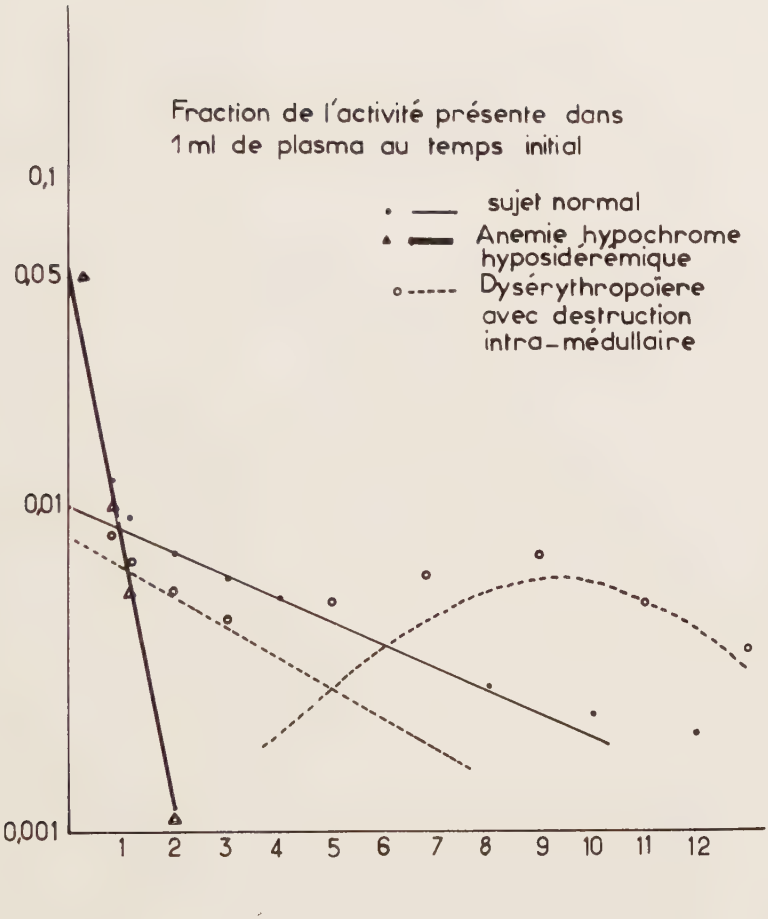


Figure 9 Courbes plasmatiques d'activité, ne tenant compte que de la fraction tardive de la courbe. On peut noter la difficulté de définir cette courbe dans le cas d'une dysérythropoïèse avec hémolyse prématurée.

Z... sujet normal

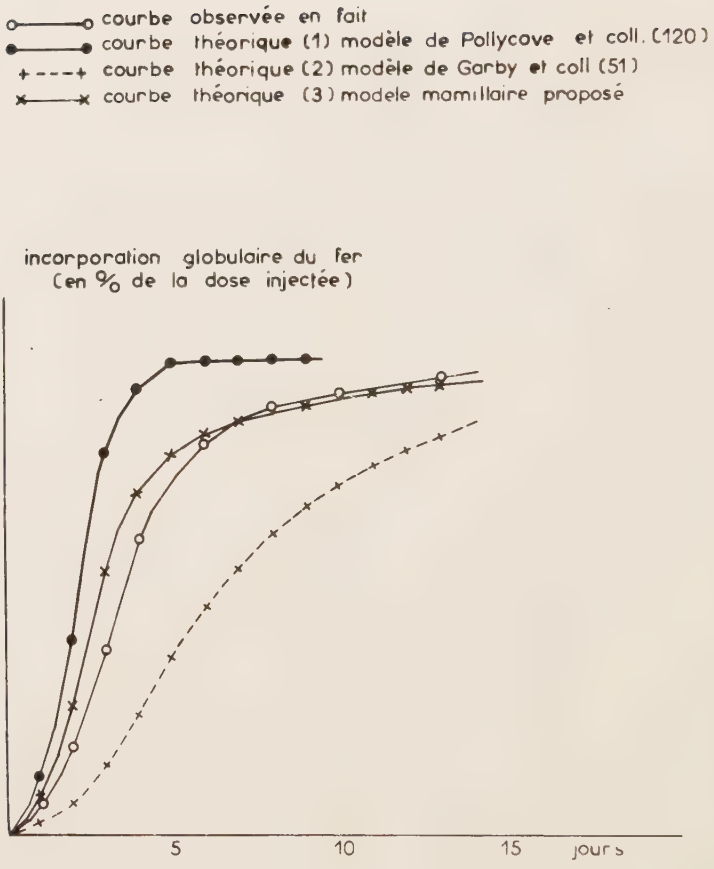


Figure 10 Courbes théoriques d'incorporation globulaire qui devraient être observées si :

- le modèle caténaire avec pool labile érythropoïétique est exact.
- le modèle caténaire avec pool labile extra- érythropoïétique est exact.
- le modèle mamillaire est exact.

Le modèle expérimentale concorde davantage avec le modèle métabolique mamillaire qu'avec les deux autres.

INTRODUCTION . . . . . Page 1

PREMIERE PARTIE : Etude de la cinétique du fer dans l'érythroblaste et le réticulocyte . . . . . Page 4

Chapitre I - Méthodes . . . . . Page 4

Chapitre II - Etude de la fixation globulaire du fer in vitro . . . . . Page 9

Chapitre III - Etude quantitative de la cinétique du fer . . Page 24

Quantité réelle d'hème synthétisée in vitro Page 24

Comparaison de la synthèse réelle d'hème et de la synthèse apparente mesurée à partir du fer plasmatique . . . . . Page 31

Cinétique du fer in vitro dans le réticulocyte normal . . . . . Page 34

Influence du vieillissement cellulaire sur la cinétique du fer . . . . . Page 51

Anomalies de la cinétique intra-cellulaire du fer dans les circonstances pathologiques Page 61

Action des réducteurs et des nucléotides de l'adénine sur la cinétique du fer in vitro Page 71

Chapitre IV - Discussion . . . . . Page 75

DEUXIEME PARTIE : Etude de la cinétique du fer dans l'organisme vivant . . . . . Page 86

Chapitre I - Méthode d'utilisation du radio-fer chez l'animal et l'homme . . . . . Page 87

Chapitre II - Mise en évidence dans les conditions normales d'un compartiment métabolique du fer échangeable avec le plasma . . . . . Page 93

Chapitre III - Système de compartiments métaboliques dans les conditions pathologiques . . . . . Page 119

Chapitre IV - Les réserves labiles . . . . . Page 129

Chapitre V - Discussion . . . . . Page 133

CONCLUSION . . . . . Page 141

BIBLIOGRAPHIE . . . . . Page 143

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

" Mécanismes du vieillissemnt et de la mort cellulaire ."

Vu et approuvé :

Paris, le 17 SEPTEMBRE *19* 65

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc. ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean ROCHE

S 1785 — Paris, Imp. Administrative Centrale, 8, rue de Furstenberg (6-63) | 463

IMPRIMERIE MURAY-PRINT
12 RUE JULES BOURDAIS — PARIS XVII[e] — GAL. 18-77